STUDIEN ZUR MERRIFIELD-SYNTHESE AN INSULIN-A-KETTEN

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

KARL-HEINZ HERZOG

aus Künzelsau

1970

STUDIEN ZUR MERRIFIELD-SYNTHESE AN INSULIN-A-KETTEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Karl-Heinz Herzog

aus Künzelsau

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 1970

Dekan: Professor Dr. E. Bayer

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

2. Berichterstatter: Dozent Dr. Dr. W. Frank

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Günther Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die Zuweisung des Themas und die großzügige Förderung während dessen Bearbeitung.

Den Herren Dr. S. Hörnle, Dr. U. Weber, K. Eisele, W. Geising, H. Großmann und J. Martin danke ich für ihre Unterstützung und Ratschläge, die ich von ihnen für meine Arbeit erhielt.

Für die Ausführung der Aminosäurenanalysen danke ich Frau Dr. A.-M. Fretzdorff.

Frau E. Hofmann danke ich für die Durchführung des Mäusefalltestes zur biologischen Aktivitätsbestimmung.

Abkürzungen

Die Abkürzungen für Aminosäuren, deren Derivate und Schutzgruppen entsprechen den von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatur heraugegebenen Empfehlungen [1, 2].

Ala	= L-Alanin
Asn	= L-Asparagin
Asp	= L-Asparaginsäure
Cys	= L-Cystein
Gln	= L-Glutamin
Glu	= L-Glutaminsäure
Gly	= Glycin
Ile	= L-Isoleucin
Leu	= L-Leucin
Phe	= L-Phenylalanin
Tyr	= L-Tyrosin
Val	= L-Valin
N-t-BOC	= N-tertiär-butyl-oxycarbonyl-Schutzgruppe
S-Bzl	= S-Benzyl-Schutzgruppe
O-Bzl	= Benzylester
ONp	= p-Nitrophenylester
DCCI	= Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	= Dicyclohexylamin
DMF	= Dimethylformamid
TÄA	= Triäthylamin
AS.	= Aminosäure

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1	Verwendete Substanzen und Geräte	4
2.2	Präparativer Teil	6
2.2.1	Synthesen der Aminosäurenderivate und der zu diesen Synthesen notwendigen Ausgangssubstanzen	6
2.2.2	Chlormethylierung des Trägerharzes	26
2.2.3	Veresterung des chlormethylierten Trägerharzes mit N-t-BOC-Aminosäuren	27
2.2.4	Schematische Darstellung der Festkörpersynthese nach Merrifield	
2.2.5	Abspaltung der synthetischen A-Ketten vom Trägerharz	30
2.2.6	Abspaltung der S-Benzylreste des Cysteins mit Na in flüssigem NH_3	30
2.2.7	Sulfitolyse der ungeschützten bzw. als asymmetrisches Disulfid geschützten A-Ketten	31
2.2.8	Reinigung der synthetischen A-Ketten nach S-Sulfonat-Gruppen	31
2.2.9	Oxydative Sulfitolyse des Rinderinsulins	35
2.2.10	Reinigung der Rinderinsulin-S-Sulfonat-B-Kette durch Ionenaustauschchromatographie	36
2.2.11	Rekombination der synthetischen A-Ketten mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette	36
2.3	Biologischer Test zur Aktivitätsbestimmung der Hybridinsuline	37
3.	ERGEBNISSE	39
3.1	Schutzgruppen	39
3.2	Reinheitskriterien der Aminosäurenderivate	39
3.3	Schema der synthetisierten Insulin-A-Ketten	40

Seite

3.4 Synthesen der Insulin-A-Ketten 41

3.4.1 Allgemeines 41
3.4.2 A-Ketten 1 - 3 41
3.4.3 A-Kette 4 43
3.4.4 A-Kette 5 44
3.4.5 A-Ketten 6 und 7 45
3.4.6 A-Kette 8 46
3.4.7 A-Ketten 9 - 12 47
3.4.8 A-Ketten 13 und 14 49
3.4.9 A-Kette 15 50
3.4.10 A-Ketten 16 und 17 50

3.5 Anreicherung eines halbsynthetischen Hybridinsulins 51

3.6 Tabelle 1 55

3.7 Aminosäurenanalysen der synthetisierten Insulin-A-Ketten 56

3.8 Tabelle 3 59

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE 61

4.1 Schutzgruppen 61

4.1.1 α-Aminoschutzgruppe 61
4.1.2 Hydroxylschutzgruppe 61
4.1.3 Carboxylschutzgruppe 61
4.1.4 SH-Schutzgruppen 62

4.2 Synthesemethoden 63

4.3 Aminosäurensequenz der synthetisierten A-Ketten 64

4.4 Reinigung der synthetischen S-SO_3-A-Ketten und Anreicherung des Hybridinsulins 66

5. ZUSAMMENFASSUNG 68

6. LITERATURVERZEICHNIS 69

LEBENSLAUF 75

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Mit der Strukturaufklärung des Insulins durch SANGER [3] und der Wiedergewinnung des aktiven Hormons aus isolierten A- und B-Ketten durch DIXON und WARDLAW [4] sowie DU et al. [5] wurden die Voraussetzungen für die Synthese dieses Hormons geschaffen.
Den Arbeitsgruppen um ZAHN [6] und KATSOYANNIS [7, 8] gelang dann 1963 die Synthese des Schafinsulins. Ein chinesischer Arbeitskreis konnte 1965 vollsynthetisches, kristallines Rinderinsulin darstellen [9]. In der Folgezeigt wurden von KATSOYANNIS mehrere halbsynthetische und vollsynthetische Insuline synthetisiert und kristallisiert [10 - 13].

Alle hier aufgeführten Arbeitsgruppen benützten die Fragmentkondensation entsprechender Peptide zu A- bzw. B-Ketten und deren anschließende Rekombination zur Synthese des Insulins.
Die Arbeitsgruppe um WEITZEL [14 - 19] verwendete zunächst ebenfalls die Methode der Fragmentkondensation zur Darstellung variierter Insulin-A-Ketten, anhand derer die Notwendigkeit der einzelnen Aminosäuren für die biologische Aktivität des Hormons untersucht wurde.
Für diese Arbeit waren die Synthesen von zahlreichen A-Ketten nötig. Hierbei zeigten sich besonders die Nachteile der Peptidsynthese mittels Fragmentkondensation, nämlich großer Zeit- und Materialaufwand bei geringen Ausbeuten.

Diese Nachteile versprach die 1963 von MERRIFIELD [20 - 29] eingeführte Peptidsynthese am Festkörper zu beheben. Mit dieser Synthesemethode gelang es MERRIFIELD [30] und ZAHN [31, 32], Insulin-A- bzw. B-Ketten mit natürlicher Sequenz zu erhalten.
Gut geeignet war diese Synthesemethode auch für die Untersuchungen von WEITZEL und Mitarbeiter [33 - 37] zur Darstellung von Insulin-Analogen, da sie es ermöglichte, in einem wesentlich kürzeren Zeitraum mit geringerem Materialaufwand die Synthese ei-

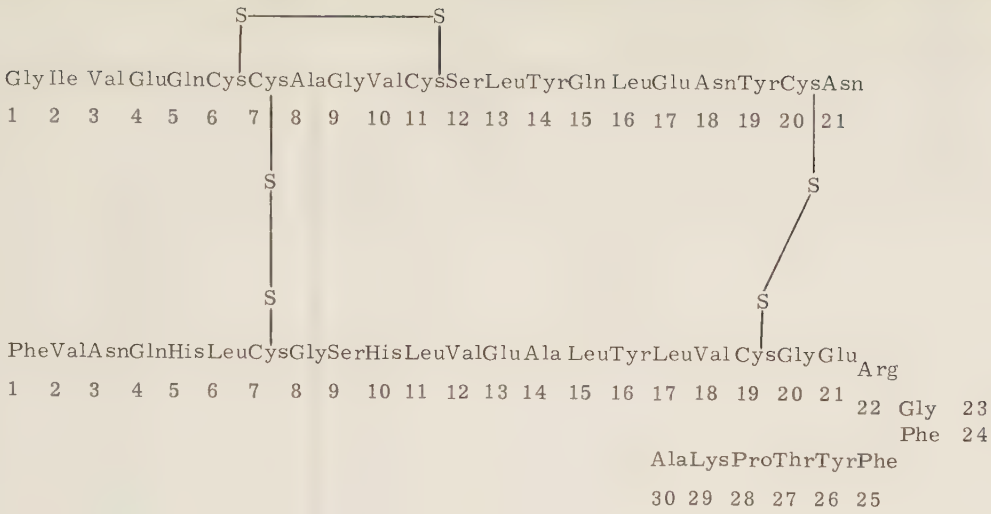
ner A-Kette durchzuführen und die Ausbeuten gegenüber der "klassischen" Methode erheblich zu steigern.

Der große Nachteil der Festkörper-Methode sind die in der Peptidsequenz auftretenden Fehlstellen, bedingt durch den nicht quantitativen Umsatz bei der Anknüpfung der einzelnen Aminosäuren. Diese Fehlstellen machen es nahezu unmöglich, mittels dieser Synthese ein völlig einheitliches Peptid darzustellen.

Die biologischen Aktivitäten der Rekombinate aus synthetischen, nach der Merrifield-Methode hergestellten A-Ketten mit natürlichen B-Ketten lagen nicht oder nur unwesentlich höher als die der Rekombinate aus "klassisch" dargestellten synthetischen A-Ketten und natürlicher B-Kette.

Diese Aktivitäten genügten zwar, um bei Austausch einer Aminosäure festzustellen, ob die betreffende variierte A-Kette nach Rekombination mit natürlicher B-Kette noch ein aktives Hybridinsulin liefert oder nicht. Zu einer genaueren Aussage über einen völligen oder teilweisen Wirkungsverlust konnte man mit diesen biologischen Aktivitäten jedoch nicht gelangen.

Die Aufgabe dieser Arbeit sollte es nun sein, mittels der Peptidsynthese am Festkörper nach MERRIFIELD Insulin-A-Ketten zu erhalten, deren Hybridinsuline mit natürlicher B-Kette eine höhere biologische Aktivität als die bisher synthetisierten und somit eine bessere Aussagekraft über die Essentialität der einzelnen Aminosäuren besitzen.



Formel des Schafinsulins

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Substanzen und Geräte

t-Butyloxycarbonylhydrazid zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
Dicyclohexylcarbodiimid zur Synthese	Merck AG, Darmstadt
Mercaptoäthanol puriss. p.a.	Fluka AG, Buchs SG
Natriumsulfit wasserfrei p.a.	Merck AG, Darmstadt
Natriumthiosulfat p.a.	Merck AG, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan p.a.	Fluka AG, Buchs SG
L-Alanin	Ajinomoto Co., Tokio
L-Asparagin	Merck AG, Darmstadt
L-Asparaginsäure	Merck AG, Darmstadt
L-Cystein	Diamalt AG, München
L-Glutamin	Merck AG, Darmstadt
L-Glutaminsäure	Diamald AG, München
Glycin	Merck AG, Darmstadt
L-Isoleucin	Ajinomoto Co., Tokio
L-Leucin	Ajinomoto Co., Tokio
L-Phenylalanin	Ajinomoto Co., Tokio
L-Tyrosin	Diamald AG, München
L-Valin	Ajinomoto Co., Tokio

Alle verwendeten Aminosäuren waren chromatographisch rein.

Trägerharz: Copolymer aus 98 % Styrol und 2 % Divinylbenzol
Fluka AG, Buchs SG

Insulin: Rinderinsulin (27 I.E./mg,
Zinkgehalt ca. 0,3 %) Farbwerke Hoechst

p-Nitrophenol (techn) wurde 2 mal aus 0,5 N HCl unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert und über NaOH getrocknet.

Triäthylamin wurde über KOH getrocknet und über eine Kolonne destilliert.

Die Lösungsmittel Äther, Dimethylformamid, Eisessig, Methylenchlorid und Tetrahydrofuran wurden nach den üblichen Methoden absolutiert. Äthanol wurde 99%ig verwendet.

Sämtliche anderen verwendeten Lösungsmittel wurden so eingesetzt, wie sie von den jeweiligen Firmen geliefert wurden.
Alle sonst eingesetzten Chemikalien waren chemisch rein.

Säulenfüllungen

Sephadex G-25 coarse	Pharmacia Uppsala
Sephadex G-50 super fine	Pharmacia Uppsala
DEAE-Sephadex A-25	Pharmacia Uppsala
Dowex 50 WX 2	Serva Heidelberg

Dialyse

Visking-Dialysierschlauch 20/32 Nr. 44110 Serva Heidelberg

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie auf DC-Karten SI F — Riedel-De Haen, Hannover

Laufmittel: n-Butanol, Eisessig, Wasser (4 : 1 : 1)

Anfärbereagenz: Mit Wasser gesättigte Lösung von Ninhydrin in n-Butanol.

Elektrophorese

Geräte: LKB Power Supply Typ 3290 B — LKB Produkter AB, Stockholm

SHANDON-Elektrophorese-Apparatur — Shandon Scientific Co. London

Träger: Schleicher und Schüll-Papier (2043 b)

Puffer: 15%ige Ameisensäure, 10%ige Essigsäure in 4 m Harnstoff

Anfärbereagenz: Pauly's Reagenz [38]

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Gerät nach Dr. Tottoli (Fa. Büchi, Flawil) bestimmt und sind nicht korrigiert.
Die Drehwerte wurden mit einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter Typ LEP A 2 der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, gemessen.
Zur pH-Messung wurde ein Titrator der Fa. Radiometer, Kopenhagen, verwendet.

Die Aminosäurenanalysen wurden mit einem Unichrom Amino Acid Analyzer der Fa. Beckman Instruments, München, durchgeführt. Bei Säulentrennungen wurde ein Fraktionssammler LKB 3400 B "Radi Rac" der Fa. LKB Produkter, Stockholm, verwendet.

2.2 Präparativer Teil

2.2.1 Synthesen der Aminosäurenderivate und der zu diesen Synthesen notwendigen Ausgangssubstanzen

Natriumtetrathionat [39]

50 g feinst gemahlenes $Na_2S_2O_3$ und 25 g Jod in 50 ml Äthanol wurden bei Zimmertemperatur geschüttelt, bis die Jodfärbung verschwunden war. Dann wurde bis zur bleibenden Färbung wiederholt äthanolische Jodlösung zugesetzt, das abgeschiedene Salz abgesaugt und mit Äthanol/Äther (1 : 1) gewaschen.
Die Umkristallisation erfolgte aus wenig jodhaltigem Wasser und Äthanol. Die erhaltenen Kristalle wurden abgesaugt und mit Äthanol und Äther gewaschen.

Ausbeute: 25 g = 59 % d. Th.

tertiär-Butyloxycarbonylazid [40]

300 g (2,26 Mol) tertiär-Butyloxycarbonylhydrazid wurden in einem Gemisch von 270 g Eisessig und 175 ml Wasser gelöst, auf 5 °C in einer Eis/Kochsalzmischung abgekühlt, und eine Lösung von 172,2 g $NaNO_2$ in 200 ml Wasser so schnell zugetropft, daß die Temperatur zwischen 5 °C und 10 °C blieb. Nach beendeter Zugabe der Nitritlösung wurde noch eine Stunde unter Eiskühlung und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter überführt, 400 ml Wasser zugegeben und die Azidphase mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden 3 mal mit 150 ml Wasser, 4 mal mit 120 ml 1 N $NaHCO_3$-Lö-

sung, 2 mal mit 200 ml Wasser nacheinander ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel bei 4 °C - 10 °C bei Wasserstrahlpumpenvakuum abgezogen. Das zurückbleibende t-BOC-Azid wurde mit Dioxan auf 500 ml aufgefüllt und die so erhaltene etwa 4 molare Azidlösung zur Darstellung der N-t-BOC-Aminosäuren verwendet.

Ausbeute: 300 g = 92 % d. Th.

$C_5H_9N_3O_2$ 143,2

Perbenzoesäure [41]

10,4 g (0,45 Mol) Na wurden in 200 ml absolutem Methanol gelöst, auf - 5 °C abgekühlt und eine Lösung von 100 g (0,42 Mol) Benzoylperoxyd in 250 ml $CHCl_3$ so schnell zugetropft, daß die Temperatur nicht über 0 °C anstieg. Nach beendeter Reaktion wurde das Na-Perbenzoat mit einmal 700 ml und 2 mal 150 ml Eiswasser aus der dickflüssigen Suspension extrahiert und anschließend die vereinigten wässrigen Auszüge wiederum 2 mal mit je 150 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde dann unter Eiskühlung mit 450 ml 1 N H_2SO_4 angesäuert, die sich abscheidende Perbenzosäure mit 4 mal 200 ml $CHCl_3$ extrahiert, die vereinigten Chloroformauszüge nochmals mit 3 mal 50 ml Wasser gewaschen, dann über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und i. V. bei 20 °C auf etwa 250 ml eingeengt. Diese Lösung wurde zu den späteren Reaktionen verwendet. Die Ausbeute an Perbenzosäure wurde durch jodometrische Titration bestimmt.

Ausbeute: 53 g = 91 % d. Th.

$C_7H_6O_3$ 138,13

Diäthylthiosulfinat [42]

Zu einer auf 0 °C abgekühlten Lösung von 40 g (320 mMol) Diäthyl-

disulfid in 250 ml $CHCl_3$ wurde die oben erhaltene Perbenzoesäurelösung so schnell zugetropft, daß die Temperatur 0 °C nicht überstieg. Nach beendeter Zugabe der Perbenzoesäurelösung wurde noch 30 min. bei 0 °C und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, dann unter kräftigem Rühren 200 ml 1 N $NaHCO_3$-Lösung zugegeben, um die unumgesetzte Perbenzoesäure aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Die wäßrige Phase wurde nun abgetrennt, die $CHCl_3$-Phase 4 mal mit je 100 ml 4 - 5%iger $NaHCO_3$-Lösung ausgeschüttelt, dann die vereinigten wäßrigen Auszüge wiederum mit 2 mal 100 ml $CHCl_3$ extrahiert. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und i. V. bei 30 °C eingedampft. Das Diäthylthiosulfinat fiel als ein leicht gelbliches Öl an.

Ausbeute: 42 g = 90 % d. Th.

$C_4H_{10}O_1S_2$ 138,25

N-t-BOC-L-alanin [43]

44,6 g (0,5 Mol) L-Alanin wurden in 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert, 140 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und am Autotitrator bei pH 10,1 unter Rühren mit 4 N NaOH titriert (Reaktionsdauer: ca. 8 h). Nach beendeter Reaktion wurde die klare Lösung bei 30 °C i. V. auf etwa 100 ml eingeengt, mit Wasser wieder auf 500 ml aufgefüllt, 3 mal mit 100 ml Äther extrahiert, die wäßrige Phase unter Eiskühlung mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die beim Ansäuern entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen und anschließend das N-t-BOC-ala mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen wurden 8 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft. Die Umkristallisation erfolgte aus Äther/Petroläther.

Ausbeute: 85 g = 90 % d. Th. Fp. 82 °C

α_{578}^{22} = - 12,5 c = 1 in Dioxan

$C_8H_{15}N_1O_4$ 189,22

N-t-BOC-L-alanin-ONp [44]

37, 9 g (0, 2 Mol) N-t-BOC-ala und 33, 4 g (0, 24 Mol) p-Nitrophenol wurden in 250 ml Essigester gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 45, 4 g (0, 22 Mol) DCCI, gelöst in 100 ml Essigester, zugegeben und je 2 h bei 0 °C und Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, mehrmals mit Essigester gewaschen, die vereinigten Filtrate i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 47 g = 75 % d. Th. Fp. 82 °C

Fp. d. Lit. 83 °C

α_D^{22} = - 52, 5 c = 2 in DMF

$C_{14}H_{18}N_2O_6$ 310, 3

N-t-BOC-asparagin [43]

75, 1 g (0, 5 Mol) L-Asparagin wurden fein zerrieben in 150 ml Wasser und 125 ml Dioxan suspendiert, 140 ml 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und unter kräftigem Rühren am pH-Stat bei pH 9, 8 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionsdauer: ca. 48 h). Nach Beendigung der Reaktion wurde auf etwa 100 ml i. V. bei 30 °C eingeengt, das dabei ausfallende Na-Salz des N-t-BOC-asn wieder mit Wasser gelöst, 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase unter Kühlung mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, das ausgefallene N-t-BOC-asn abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und aus Wasser/Äthanol (4 : 1) umkristallisiert.

Ausbeute: 70 g = 60 % d. Th. Fp. 174 - 176 °C

α_{578}^{22} = - 8, 5 c = 1 in DMF

$C_9H_{16}N_2O_5$ 232, 3

N-t-BOC-L-asparagin-ONp [45]

56 g (0, 24 Mol) N-t-BOC-asn und 37, 6 g (0, 27 Mol) p-Nitrophenol

wurden in 500 ml Tetrahydrofuran und 180 ml DMF gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 51,5 g (0,25 Mol) DCCI, in 100 ml Tetrahydrofuran gelöst, zugegeben und bei 0 °C unter Feuchtigkeitsausschluß 6 h gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, mehrmals mit Tetrahydrofuran gewaschen, das Filtrat und die Waschflüssigkeiten i. V. bei 25 °C so weit wie möglich eingedampft, die zurückbleibende DMF-Lösung nochmals filtriert, dann mit 500 ml Essigester versetzt, 5 mal mit verdünnter $NaHCO_3$-Lösung, 3 mal mit Wasser, einmal mit 10%iger Citronensäurelösung und 2 mal mit Wasser ausgeschüttelt, die Essigesterphase über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft. Der Rückstand wurde 2 - 3 mal aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 35 g = 42 % d. Th. Fp. 153 - 154 °C

Fp. d. Lit. 157 - 158 °C

$\alpha_D^{22} = -45,3$ c = 1 in DMF

$C_{15}H_{19}N_3O_7$ 353,3

L-Asparaginsäure-ß-benzylester [46]

400 ml absoluter Äther wurden auf 0 °C abgekühlt und nacheinander 40 ml konz. H_2SO_4 p.a. und 400 ml frisch destillierter Benzylalkohol langsam zugetropft. Anschließend wurde der Äther i. V. abgezogen, zu der zurückbleibenden Lösung 53,4 g (0,4 Mol) feingepulverte L-Asparaginsäure in kleinen Portionen unter kräftigem Rühren zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde nun abgekühlt, 800 ml Äthanol zugefügt, dann unter Rühren 200 ml Pyridin zugetropft und anschließend 12 h bei 0 °C zur Kristallisation belassen. Der ausgefallene L-Asp-ß-OBzl wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen, aus Wasser, dem einige Tropfen Pyridin zugesetzt sind, umkristallisiert und zur Entfernung des Pyridins i. V. über konz. H_2SO_4 getrocknet.

Ausbeute: 35 g = 63 % d. Th. Fp. 218 - 220 °C

$\alpha_D^{25} = +28,1$ c = 1 in 1 N HCl

$C_{11}H_{13}N_1O_4$ 223,1

N-t-BOC-L-asparaginsäure-ß-benzylester [43, 47]

66, 9 g (0, 3 Mol) L-Asp-ß-OBzl wurden in 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert, 90 ml 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und unter Rühren am pH-Stat bei pH 9, 5 mit 4 N NaOH titriert. (Reaktionsdauer: 16 h). Das Reaktionsgemisch wurde bei 30 °C auf etwa 100 ml eingeengt, mit Wasser auf 500 ml wieder aufgefüllt, 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase unter Kühlung mit Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 bei 0 °C i. V. abgezogen, der N-t-BOC-asp-ß-OBzl mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen 8 mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft. Die Umkristallisation erfolgte aus Essigester/Petroläther, dabei wurde ein Öl abgetrennt, das sich zu Anfang abschied.

Ausbeute: 68 g = 70 % d. Th. Fp. 95 - 97 °C

$\alpha^{22}_{578} = +7,1$ c = 1 in Eisessig

$C_{16}H_{21}N_1O_6$ 323, 5

S-Bzl-L-cystein [48]

72, 6 g (0, 6 Mol) L-Cystein wurden in einem Gemisch von 270 ml 2 N NaOH und 450 ml Äthanol gelöst, zu dieser Lösung langsam unter kräftigem Rühren 113 g Benzylbromid im Verlauf von 2 - 3 h zugetropft, noch 2 h gerührt und über Nacht bei 0 °C belassen. Das ausgefallene S-Bzl-cys wurde abgesaugt, mit Wasser und Äther gewaschen und das noch feuchte Produkt aus 4 - 5 l kochendem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 105 g = 83 % d. Th. Fp. 211 °C

$C_{10}H_{13}N_1O_2S_1$ 211, 4

N-t-BOC-S-Bzl-L-cystein [43]

105,7 g (0,5 Mol) S-Bzl-cys wurden in 250 ml Wasser und 250 ml Dioxan suspendiert, 140 ml 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und am Autotitrator unter Rühren bei pH 9,6 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: 20 h). Das Reaktionsgemisch wurde dann i. V. bei 30 °C eingedampft, bis das Na-Salz des N-t-BOC-S-Bzl-cys ausfiel, durch Zugabe von Wasser wieder eine klare Lösung hergestellt, diese 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase unter kräftigem Rühren in eine ausreichende Menge Citronensäurelösung unter guter Kühlung eingetropft, das ausgefallene N-t-BOC-S-Bzl-cys abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen.
Anschließend wurde das N-t-BOC-S-Bzl-cys in Essigester gelöst, 2 mal mit 100 ml halbgesättigter Citronensäurelösung und 10 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, die Essigesterphase über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet, i. V. bei 25 °C eingedampft, der ölige Rückstand in Äther aufgenommen, bis zur Trübung mit Petroläther zugesetzt, diese wieder durch Erwärmen im Wasserbad beseitigt, einige Impfkristalle zugegeben und langsam abkühlen gelassen. Dabei kristallisierte das N-t-BOC-S-Bzl-cys schön aus.

Ausbeute: 125 g = 80 % d. Th. Fp. 86 - 87 °C
Fp. d. Lit. 63 - 65 °C
α_{578}^{22} = - 45,5 c = 1 in Eisessi

$C_{15}H_{21}N_1O_4S_1$ 311,4

N-t-BOC-S-Bzl-L-cystein-ONp [49]

31,2 g (0,1 Mol) N-t-BOC-S-Bzl-cys und 16,8 g (0,12 Mol) p-Nitrophenol wurden in 150 ml Essigester gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 22,7 g (0,11 Mol) DCCI, gelöst in 100 ml Essigester, zugegeben und 4 h bei 0 °C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der abgeschiedene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, gut mit Essigester gewaschen, das Filtrat und die Waschflüssigkeiten vereinigt, i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand aus Äthanol und wenig Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 40 g = 92 % d. Th. Fp. 95 - 96 °C

α_D^{22} = - 37,5 c = 1 in DMF

$C_{21}H_{24}N_2O_6S_1$ 432,5

S-Äthyl-mercapto-L-cystein [50, 35]

24,3 g (0,2 Mol) L-Cystein wurden in einer äquivalenten Menge 1 N HCl gelöst, 40 g (0,29 Mol) Diäthylthiosulfinat in wenig Äthanol gelöst zugegeben und mit 2 N NaOH unter kräftigem Rühren auf pH 6,5 eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend noch eine Stunde gerührt, auf 0 °C abgekühlt, das ausgefallene S-Äthyl-mercapto-cys abgesaugt, mit Wasser, wenig Äthanol und Äther gewaschen und aus siedendem Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 30 g = 83 % d. Th. Fp. 205 - 208 °C

α_D^{15} = - 148,3 c = 1 in 1 N HCl

$C_5H_{11}N_1O_2S_2$ 181,3

S-Benzyl-mercapto-L-cystein [51]

Diese Verbindung wurde aus den entsprechenden Verbindungen analog dem S-Äthyl-mercapto-cys dargestellt. Lediglich nach Einstellung des pH auf 6,5 wurde noch 12 h gerührt. Auf eine Umkristallisation wurde verzichtet.

Ausbeute: 80 % d. Th. Fp. 189 - 190 °C

$C_{10}H_{13}N_1O_2S_2$ 243,3

N-t-BOC-S-äthyl-mercapto-L-cystein [35]

Eine Mischung von 45 g (0,25 Mol) S-Äthyl-mercapto-cystein, 500 ml Wasser, 700 ml Dioxan, 105 ml Triäthylamin und 100 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan wurden unter Rühren 20 h bei 45 °C

gehalten, das Reaktionsgemisch anschließend i. V. bei 30 °C eingedampft, mit 500 ml Wasser wieder aufgenommen, die wäßrige Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die dabei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, das N-t-BOC-S-äthyl-mercapto-cystein mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterextrakte 10 mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die Essigesterphase über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft.

Der Rückstand wurde in etwa 200 ml Äther gelöst, 50 g (0,275 Mol) Dicyclohexylamin zugefügt und durch Zugabe von Petroläther das Dicyclohexylammonium-Salz zur Kristallisation gebracht. Die Umkristallisation des DCHA-Salzes erfolge aus Aceton; Ungelöstes muß unbedingt abfiltriert werden.

Ausbeute (DCHA-Salz): 100 g = 84 % d. Th.
Fp. (DCHA-Salz): 137 - 138 °C

Das N-t-BOC-S-äthyl-mercapto-cys DCHA-Salz wurde im Scheidetrichter so lange mit einem Gemisch von Essigester und gesättigter Citronensäurelösung geschüttelt, bis beide Phasen klar waren. Die Essigesterphase wurde nochmals mit verdünnter Citronensäurelösung ausgeschüttelt, dann 10 mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und i. V. bei 25 °C auf etwa 100 ml eingeengt. Die so erhaltene Essigesterlösung wurde bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt, ein sich zunächst abscheidendes Öl (ca. 10 g) abgetrennt und der klare Überstand unter Zusatz von einigen Impfkristallen bei 0 °C zur Kristallisation belassen.

Ausbeute: 53 g = 75 % d. Th. Fp. 71 ° - 73 °C

α_D^{20} = - 104 c = 1 in Methanol

$C_{10}H_{19}N_1O_4S_2$ 281,4

N-t-BOC-S-benzyl-mercapto-L-cystein [51]

Die Darstellung erfolgte völlig analog dem N-t-BOC-S-äthyl-mercapto-L-cystein.

Ausbeute: 35 % d. Th. Fp. 74 - 75 °C

α_{578}^{22} = - 82 c = 1 in Methanol

$C_{15}H_{21}N_1O_4S_2$ 343, 5

N-t-BOC-L-glutamin [43]

73, 1 g (0, 5 Mol) L-Glutamin wurden in einem Gemisch von 200 ml Wasser und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugefügt und unter Rühren am pH-Stat bei pH 10, 3 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: 20 h). Nach Ende der Reaktion wurde i. V. bei 30 °C auf etwa 100 ml eingeengt, mit Wasser wieder auf 500 ml aufgefüllt, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, die Suspension mit NaCl gesättigt und das N-t-BOC-gln mit 10 mal 150 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterphasen wurden 5 mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet, i. V. bei 25 °C eingedampft, der Rückstand in 250 ml Essigester unter Erwärmen gelöst, Impfkristalle zugegeben und zur Kristallisation stehen gelassen.

Ausbeute: 86 g = 70 % d. Th. Fp. 116 - 118 °C

α_{578}^{22} = - 3, 0 c = 1 in Äthanol

$C_{10}H_{18}N_2O_5$ 246, 3

N-t-BOC-L-glutamin-ONp [52]

49, 3 g (0, 2 Mol) N-t-BOC-gln und 30, 6 g (0, 22 Mol) p-Nitrophenol

wurden in 150 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, auf - 20 °C abgekühlt, dann 41,2 g (0,2 Mol) DCCI in wenig Tetrahydrofuran gelöst zugegeben, 5 h bei - 10 ° bis - 20 °C gerührt und über Nacht bei 0 °C stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde auf 30 °C erwärmt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, gut mit warmem Tetrahydrofuran gewaschen, das Filtrat und die Waschflüssigkeiten vereinigt, i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand mehrmals aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 47 g = 64 % d. Th. Fp. 144,5 - 146 °C

α_D^{22} = - 31 c = 1 in Essigester

$C_{16}H_{21}N_3O_7$ 367,4

L-Glutaminsäure-γ-benzylester [53]

Zu 500 ml Äther wurden unter Eiskühlung 50 ml konz. H_2SO_4 p.a. zugetropft, dann langsam 500 ml frisch destillierter Benzylalkohol zugefügt und anschließend der Äther i. V. abgezogen. Zu der zurückbleibenden Lösung wurden 73,5 g (0,5 Mol) L-Glutaminsäure in kleinen Portionen zugesetzt, danach noch 20 h gerührt. Die entstandene klare Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt, nacheinander 1 l 96%-iges Äthanol und 250 ml Pyridin zugegeben, über Nacht bei - 20 °C stehen gelassen, der ausgefallene L-Glu-γ-OBzl schnell abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und mehrmals aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 90 g = 75 % d. Th. Fp. 185 °C

Fp. d. Lit. 186 - 189 °C

α_D^{22} = + 27,7 c = 2,5 in 1 N HC

$C_{12}H_{15}O_4N_1$ 237,3

N-t-BOC-L-glutaminsäure-γ-benzylester [43, 47]

118,5 g (0,5 Mol) L-Glu-γ-OBzl wurden in 400 ml Wasser und 400 ml

Dioxan suspendiert, 150 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugegeben und unter Rühren am pH-Stat bei pH 9,5 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: ca. 15 h). Das Reaktionsgemisch wurde i. V. bei 30 °C eingeengt, bis das Na-Salz des N-t-BOC-glu-γ-OBzl ausfiel, bis zum Entstehen einer klaren Lösung wieder Wasser zugefügt, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, der N-t-BOC-glu-γ-OBzl mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen 8 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, die Essigesterphase über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft. Der ölige Rückstand wurde in 250 ml Äther gelöst, unter Kühlung 91 g (0,5 Mol) Dicyclohexylamin zugefügt und das DCHA-Salz durch Zusatz von Petroläther gefällt. Die Umkristallisation des N-t-BOC-glu-γ-OBzl DCHA-Salzes erfolgte aus Aceton, dem eine Spur Äthanol zugesetzt wurde.

Ausbeute (DCHA-Salz): 130 g = 50 % d. Th.
Fp. 140 - 141 °C Fp. d. Lit. 140 - 142 °C

Das erhaltene DCHA-Salz wurde in einem Gemisch von 1 l Essigester und 500 ml gesättigter Citronensäurelösung suspendiert und so lange geschüttelt, bis beide Phasen klar waren. Die Essigesterphase wurde abgetrennt, nochmals mit verdünnter Citronensäurelösung und 10 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft.
Da die Kristallisation aus Essigester/Petroläther nur sehr schlecht geht und da das erhaltene Öl nach Abspaltung des N-t-BOC-Restes mit 1 N HCl in Eisessig chromatographisch nur L-Glu-γ-OBzl zeigte, wurde eine 1 - 2 m Lösung dieses Öls zur Synthese verwendet.

Ausbeute: 76 g = 45 % d. Th. Fp. 53 - 56 °C

$\alpha_D^{22} = -9,8$ c = 1 in Methanol

$C_{17}H_{23}N_1O_6$ 337,5

N-t-BOC-L-glutaminsäure-γ-OBzl-α-ONp [44]

33,8 g (0,1 Mol) N-t-BOC-glu-γ-OBzl und 16,7 g (0,12 Mol) p-Nitrophenol wurden in 150 ml Essigester gelöst, auf - 10 °C abgekühlt, 20,6 g (0,1 Mol) DCCI, gelöst in 75 ml Essigester, zugegeben und 2 h bei - 10 °C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, gut mit Essigester gewaschen, die vereinigten Filtrate i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 39 g = 85 % d. Th. Fp. 119 °C

Fp. d. Lit. 123 °C

α_D^{22} = - 33,5 c = 2 in DMF

$C_{23}H_{26}N_2O_8$ 458,6

N-Acetyl-glycin [54]

100 g (1,33 Mol) Glycin und 150 ml Acetanhydrid wurden am Rückfluß gekocht, bis eine dunkelbraune sirupöse Masse entstand. Diese wurde abgesaugt, der Rückstand in Wasser gelöst und so lange Chlor in diese Lösung eingeleitet, bis diese nur noch schwach gelb gefärbt war. Nun wurde i. V. bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt und kaltgestellt. Das abgeschiedene N-Acetyl-gly wurde abgesaugt, in heißem Wasser gelöst, mit Aktivkohle behandelt, filtriert und zur Kristallisation über Nacht bei 0 °C belassen.

Ausbeute: 47 g = 30 % d. Th. Fp. 205 °C

$C_4H_7N_1O_3$ 117,1

N-Acetyl-glycin-ONp

23,4 g (0,2 Mol) N-Acetyl-gly und 30,8 g (0,22 Mol) p-Nitrophenol wurden in 200 ml DMF gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 41,2 g (0,2 Mol) DCCI, in wenig DMF gelöst, zugegeben und 8 h bei Raumtemperatur

gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, mit wenig DMF gewaschen, der Ester durch Eingießen der DMF-Filtrate in eiskalte gesättigte NaCl-Lösung gefällt, gut mit kaltem Wasser gewaschen, über P_2O_5 i. V. getrocknet und aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 24 g = 50 % d. Th. Fp. 125 - 127 °C

$C_{10}H_{10}N_2O_5$ 238,2

N-t-BOC-glycin [43]

37,6 g (0,5 Mol) Glycin wurden in 200 ml Wasser und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung zugefügt und unter Rühren am Autotitrator bei pH 10 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: 8 h), nach beendeter Reaktion i. V. bei 35 °C eingedampft, der Rückstand wieder in Wasser gelöst, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die dabei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, das N-t-BOC-gly mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen 10 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet, filtriert, i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 75 g = 85 % d. Th. Fp. 94 - 95 °C

$C_7H_{13}N_1O_4$ 175,1

N-t-BOC-glycin-ONp [44]

35 g (0,2 Mol) N-t-BOC-gly und 30,6 g (0,22 Mol) p-Nitrophenol wurden in 200 ml Essigester gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 41,2 g (0,2 Mol) DCCI, in Essigester gelöst, zugegeben, 2 h bei 0 °C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, gut mit Essigester gewaschen, die vereinigten Essigesterfiltrate i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand aus Äthanol/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 50 g = 85 % d. Th. Fp. 68 - 68,5 °C

$C_{13}H_{16}N_2O_6$ 296,3

N-t-BOC-L-isoleucin [43]

65,5 g (0,5 Mol) L-Isoleucin wurden in 250 ml Wasser und 250 ml Dioxan suspendiert, 150 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugefügt, unter Rühren bei pH 9,8 am pH-Stat mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: ca. 14 h), das Reaktionsgemisch anschließend i. V. bei 30 °C bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft, das ausgefallene Na-Salz des N-t-BOC-ile durch Zugabe von Wasser wieder gelöst, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, das N-t-BOC-ile mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen 6 mal mit gesättigter NaCl-Lösung und 3 mal mit Wasser ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet, i. V. bei 25 °C eingedampft, aus Petroläther umkristallisiert, abgesaugt und mit n-Hexan gewaschen.

Ausbeute: 100 g = 87 % d. Th. Fp. 66 - 68 °C

$\alpha_{578}^{22} = +2,5$ c = 1 in Eisessig

$C_{11}H_{21}N_1O_4$ 231,3

N-t-BOC-L-isoleucin-ONp

23,2 g (0,1 Mol) N-t-BOC-ile und 16,7 g (0,12 Mol) p-Nitrophenol wurden in 150 ml Essigester gelöst, auf - 5 °C abgekühlt, 20,6 g (0,1 Mol) DCCI, in wenig Essigester gelöst, zugegeben, 2 h bei - 5 °C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, gut mit Essigester gewaschen, die vereinigten Essigesterfiltrate i. V. bei 25 °C eingedampft, der verbleibende Rückstand in wenig Äthanol gelöst, über

Aktivkohle filtriert und durch Zugabe von viel Petroläther zur Kristallisation gebracht. Das erhaltene Produkt mußte noch mehrere Male wie beschrieben umkristallisiert werden.

Ausbeute: 14 g = 40 % d. Th. Fp. 66 - 68 °C

α_{578}^{22} = - 22 c = 1 in Essigester

$C_{17}H_{24}N_2O_6$ 352, 4

N-t-BOC-L-leucin · 1/2 H_2O [43]

66 g (0, 5 Mol) L-Leucin wurden in einem Gemisch von 200 ml Wasser und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung zugegeben, am pH-Stat bei pH 9, 75 unter Rühren mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: ca. 24 h), das Reaktionsgemisch i. V. bei 30 °C eingedampft, wieder in Wasser gelöst, diese Lösung mit Äther 3 mal extrahiert und die wäßrige Phase unter kräftigem Rühren in eine ausreichende Menge gut gekühlte gesättigte Citronensäurelösung eingetropft. (Der pH der entstehenden Suspension muß nach beendeter Zugabe bei 2 - 3 liegen.) Das ausgefallene N-t-BOC-leu wurde abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen, noch feucht in Tetrahydrofuran gelöst, zu dieser Lösung Aktivkohle zugegeben, leicht erwärmt, filtriert und das Filtrat bis zur Trübung mit Petroläther versetzt. Beim Abkühlen kristallisierte das N-t-BOC-leu · 1/2 H_2O in schönen Blättchen. Das Derivat kann durch Trocknen i. V. über P_2O_5 entwässert werden.

Ausbeute: 101 g = 84 % d. Th. Fp. 78 - 81 °C

α_{578}^{22} = - 30 c = 1 in Eisessig

$C_{11}H_{21}N_1O_4$ · 1/2 H_2O 240, 3

N-t-BOC-L-leucin-ONp [49]

24, 1 g (0, 1 Mol) N-t-BOC-leu · 1/2 H_2O und 16, 7 g (0, 12 Mol)

p-Nitrophenol wurden in 150 ml Essigester gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 30,9 g (0,15 Mol) DCCI, in Essigester gelöst, zugegeben, 2 h bei 0 °C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, gut mit Essigester gewaschen und die vereinigten Filtrate i. V. bei 25 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in möglichst wenig Äthanol gelöst, mit Petroläther bis zur beginnenden Trübung versetzt und über Nacht bei - 20 ° zur Kristallisation belassen. Mehrfaches Umkristallisieren ist meist erforderlich, um ein sauberes Produkt zu erhalten.

Ausbeute: 25 g = 71 % d. Th. Fp. 91 - 92 °C

α_D^{22} = - 48 c = 0,9 in DMF

$C_{17}H_{24}O_6N_2$ 352,4

N-t-BOC-L-phenylalanin [43]

82,6 g (0,5 Mol) L-Phenylalanin wurden in einem Gemisch von 200 ml Wasser und 200 ml Dioxan suspendiert, 150 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugefügt, unter Rühren am pH-Stat bei pH 10,1 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: ca. 15 h), anschließend das Reaktionsgemisch i. V. bei 30 °C auf etwa 100 ml eingeengt, mit Wasser wieder auf 500 ml aufgefüllt, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, das N-t-BOC-phe mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterextrakte 8 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet, filtriert, i. V. bei 25 °C eingedampft und aus Äther/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 120 g = 91 % d. Th. Fp. 84 - 86 °C

α_{578}^{22} = - 4 c = 1 in Eisessig

$C_{14}H_{19}N_1O_4$ 265,3

N-t-BOC-L-phenylalanin-ONp [44]

26, 6 g (0, 1 Mol) N-t-BOC-phe und 16, 7 g (0, 12 Mol) p-Nitrophenol wurden in 150 ml Essigester gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 20, 6 g (0, 1 Mol) DCCI, in Essigester gelöst, zugegeben und 2 h bei 0 °C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, gut mit Essigester gewaschen, die vereinigten Essigesterfiltrate i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 35 g = 90 % d. Th. Fp. 127 - 128 °C

α_D^{22} = - 12 c = 1 in Methanol

$C_{20}H_{22}N_2O_6$ 386, 4

N-t-BOC-O-Bzl-L-serin [55]

18, 3 g (0, 1 Mol) O-Bzl-L-serin [56, 57, 58] wurden in einem Gemisch von 100 ml Wasser und 100 ml Dioxan suspendiert, 30 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung zugefügt, am pH-Stat unter Rühren bei pH 9, 5 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: 10 h), das Reaktionsgemisch i. V. bei 30 °C weitgehend eingedampft, mit Wasser wieder aufgenommen, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, das N-t-BOC-O-Bzl-ser mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen 8 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet, filtriert und i. V. bei 25 °C eingedampft. Die Kristallisation erfolgte aus Essigester/Petroläther unter kräftigem Rühren mit einem Magnetrührer.

Ausbeute: 21, 8 g = 60 % d. Th. Fp. 58 - 60 °C

α_{578}^{22} = + 35 c = 1 in THF

$C_{14}H_{21}N_1O_5$ 263, 2

O-Bzl-L-tyrosin [59]

144,8 g (0,8 Mol) L-Tyrosin wurden mit 400 ml 2 N NaOH 15 min gerührt, 100 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ in 300 ml Wasser gelöst zugegeben und eine weitere halbe Stunde gerührt. Der ausgefallene blaue Cu-Komplex wurde mit 3 l Methanol und 400 ml 2 N NaOH in Lösung gebracht, die blaugrüne Lösung noch 10 min gerührt, Ungelöstes abzentrifugiert, zu der klaren Lösung 100 ml Benzylbromid auf einmal zugegeben, in einem geschlossenen 4 l-Dreihalskolben nochmals eine Stunde gerührt, anschließend der ausgefallene O-Bzl-tyr-Cu-Komplex abgesaugt, mit Wasser/Methanol (3,5 : 1) gewaschen und an der Luft getrocknet. Der Cu-Komplex wurde durch mehrmaliges Zerreiben mit 1 N HCl zerstört, mit Wasser, verd. NH_3 und nochmals mit Wasser gewaschen, mehrmals in Aceton aufgeschlämmt, bis das Filtrat nicht mehr braun war, an der Luft getrocknet, aus 80%iger Essigsäure umkristallisiert und über NaOH getrocknet.

Ausbeute: 109 g = 50 % d. Th. Fp. 220 - 222 °C
Fp. d. Lit. 223 °C
$\alpha_D^{22} = -10$ c = 1 in 80 % Essigsäure

$C_{16}H_{17}N_1O_3$ 271,3

N-t-BOC-O-Bzl-L-tyrosin [43]

68 g (0,25 Mol) O-Bzl-tyr wurden in einem Gemisch von 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan gelöst, 75 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung zugegeben, unter Rühren bei pH 10,4 am pH-Stat mit 4 N NaOH titriert (Reaktionszeit: 24 h), das Reaktionsgemisch i. V. bei 30 °C weitgehend eingedampft, mit Wasser wieder aufgenommen, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert, die wäßrige Phase unter Kühlung und kräftigem Rühren mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen und das N-t-BOC-O-Bzl-tyr mit Essigester extrahiert. Ein Teil der Substanz löst sich weder in Wasser noch in Essigester, der Inhalt des Scheidetrichters wurde daher durch eine Nutsche gesaugt und der Rück-

stand gut mit Essigester gewaschen. Die vereinigten Essigesterphasen wurden 1 mal mit verdünnter Citronensäurelösung und 10 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zugabe von Aktivkohle getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft. Die Kristallisation erfolgte aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 74 g = 80 % d. Th. Fp. 108 - 110 °C

α_{578}^{22} = + 12, 1 c = 1 in Aceton

$C_{21}H_{25}N_1O_5$ 371, 4

N-t-BOC-O-Bzl-L-tyrosin-ONp [52]

37, 2 g (0, 1 Mol) N-t-BOC-O-Bzl-tyr und 16, 7 g (0, 12 Mol) p-Nitrophenol wurden in 100 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 20, 6 g (0, 1 Mol DCCI, in wenig Tetrahydrofuran gelöst, zugegeben, 6 h bei 0 °C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, gut mit Tetrahydrofuran gewaschen, die vereinigten Filtrate i. V. bei 25 °C eingedampft und der Rückstand aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 45 g = 91 % d. Th. Fp. 145 - 146 °C

α_D^{22} = - 30, 2 c = 1 in DMF

$C_{27}H_{28}N_2O_7$ 492, 5

N-t-BOC-L-valin [43]

59 g (0, 5 Mol) L-Valin wurden in einem Gemisch von 150 ml Wasser und 150 ml Dioxan suspendiert, 150 ml einer 4 m t-BOC-Azid-Lösung in Dioxan zugefügt, unter Rühren am pH-Stat bei pH 9, 5 mit 4 N NaOH titriert (Reaktionsdauer: 20 h), anschließend das Reaktionsgemisch bei 30 °C i. V. weitgehend eingedampft, mit Wasser wieder aufgenommen, diese Lösung 3 mal mit Äther extrahiert,

die wäßrige Phase mit fester Citronensäure auf pH 2 - 3 angesäuert, die hierbei entstehende HN_3 i. V. bei 0 °C abgezogen, das N-t-BOC-val mit Essigester extrahiert, die vereinigten Essigesterphasen 10 mal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über wasserfreiem $MgSO_4$ unter Zusatz von Aktivkohle getrocknet, filtriert, i. V. bei 25 °C eingedampft und aus Äther/Petroläther kristallisiert.

Ausbeute: 95 g = 87 % d. Th. Fp. 72 - 73 °C

$\alpha_{578}^{22} = -6$ c = 1 in Eisessig

$C_{10}H_{19}N_1O_4$ 217,3

N-t-BOC-L-valin-hydroxysuccinimidester [60]

44 g (0,2 Mol) N-t-BOC-val und 26 g Hydroxysuccinimid wurden in 500 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, auf 0 °C abgekühlt, 41,2 g (0,2 Mol) DCCI, in 100 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst, langsam zugefügt, 2 h bei 0 °C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, gut mit Tetrahydrofuran gewaschen und die vereinigten Filtrate i. V. bei 25 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen, je 2 mal mit 0,5 N $NaHCO_3$-Lösung und Wasser extrahiert, die Essigesterphase über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und i. V. bei 25 °C eingedampft. Die Umkristallisation erfolgte aus Äthanol/Petroläther.

Ausbeute: 50 g = 80 % d. Th. Fp. 127 - 128 °C

$\alpha_D^{22} = -37$ c = 2 in Dioxan

$C_{14}H_{22}N_2O_6$ 314,3

2.2.2 Chlormethylierung des Trägerharzes [61]

50 g Copolymer aus 98 % Styrol und 2 % Divinylbenzol (Fluka AG, Buchs) wurden mit DMF, Wasser, 1 N NaOH, 1 N HCl, Wasser,

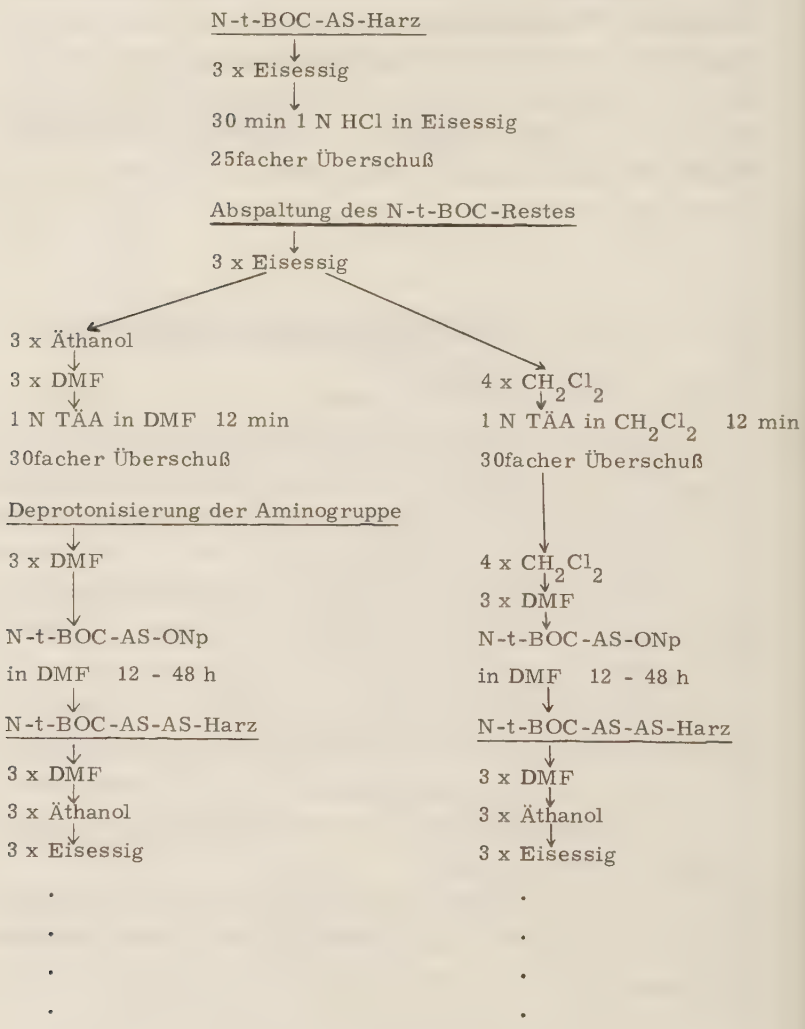
DMF und Methanol gut gewaschen, über $CaCl_2$ i. V. getrocknet, in einem 1 l-Dreihalskolben in 200 ml Chlormethyl-methyläther und 150 ml $CHCl_3$ suspendiert, eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, auf 0 °C abgekühlt, 5 ml wasserfreies $SnCl_4$ zugegeben und eine Stunde bei 0 °C weitergerührt.
Anschließend wurde das Harz abgesaugt und mit je 500 ml Dioxan/H_2O (3 : 1), Dioxan/3 N HCl (3 : 1), Dioxan/Methanol (1 : 1), Dioxan/Methanol (1 : 2), Dioxan/Methanol (1 : 4) und noch mehrmals mit reinem Methanol gewaschen. Das so erhaltene Harz enthielt 1, 4 mMol Chlor pro 1 g Harz.

2.2.3 Veresterung des chlormethylierten Trägerharzes mit N-t-BOC-Aminosäuren [62]

50 g chlormethyliertes Harz wurden in einem Gemisch von Essigester/Äthanol (1 : 1) suspendiert, eine dem Chlorgehalt äquivalente Menge an N-t-BOC-Aminosäure und Triäthylamin zugegeben und unter Rühren 48 h bei 80 °C am Rückfluß gekocht.
Anschließend wurde das Harz abgesaugt, 4 mal mit je 500 ml Äthanol/Essigester (1 : 1), 4 mal mit je 500 ml Äthanol/Essigester (3 : 1) und 8 mal mit 500 ml Methanol gewaschen und getrocknet.
Zur Bestimmung der mit dem Harz veresterten Aminosäuremenge wurde eine Probe des Harzes in einem Gemisch von Eisessig/konz. HCl in einem zugeschmolzenen Glasrohr bei 110 °C hydrolysiert. Die hierbei freigewordene Aminosäuremenge wurde colorimetrisch mittels Ninhydrin bestimmt.
Bei Veresterung mit N-t-BOC-ala enthielt das Harz 0, 4 - 0, 6 mMol N-t-BOC-ala pro g Harz, bei Veresterung mit N-t-BOC-asn wurden Beladungen von 0, 2 - 0, 3 mMol N-t-BOC-asn pro g Harz erzielt.

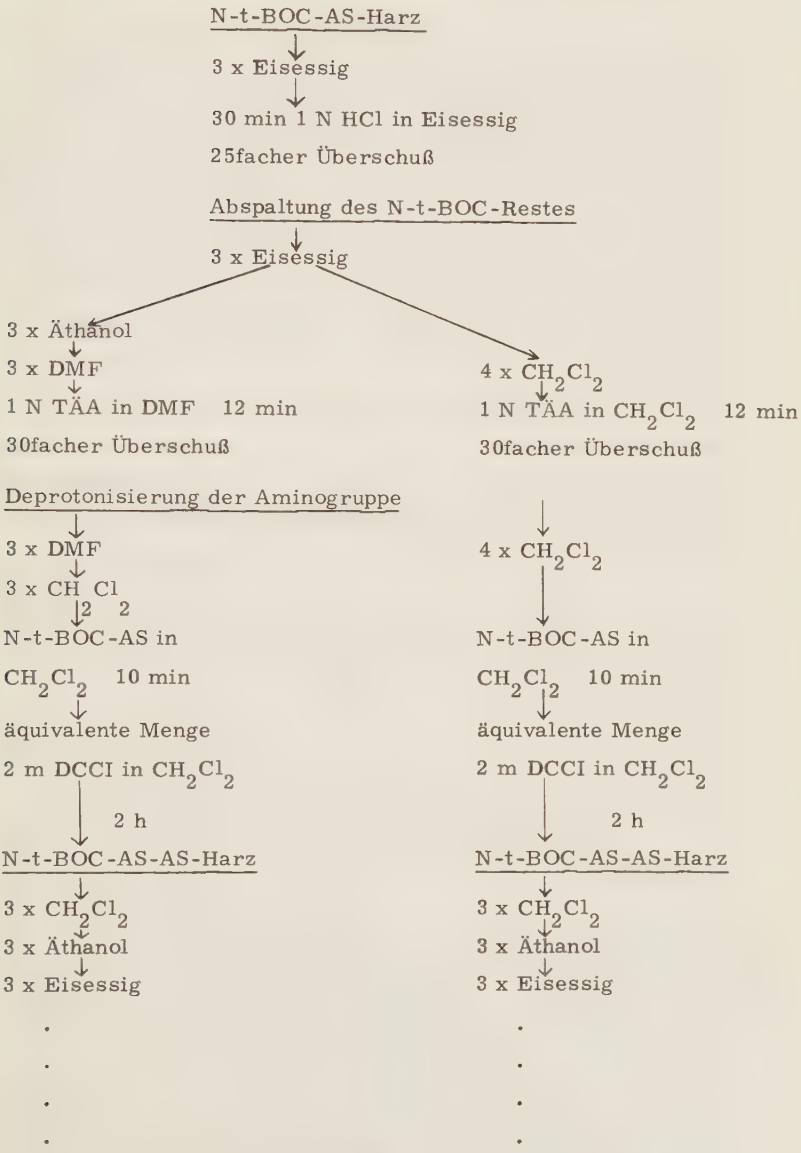
2.2.4 Schematische Darstellung der Festkörpersynthese nach Merrifield

Kettenverlängerung mittels N-t-BOC-Aminosäuren-ONp



Die Zeit für die jeweiligen Waschgänge betrug 3 min.

Kettenverlängerung mittels DCCI und N-t-BOC-Aminosäuren



Die Zeit für die jeweiligen Waschgänge betrug 3 min.

2.2.5 Abspaltung der synthetischen A-Ketten vom Trägerharz [63]

Das mit etwa einem mMol synthetischer A-Kette beladene Harz wurde in einem Merrifield-Synthesegefäß in 40 ml wasserfreier Trifluoressigsäure suspendiert und unter Feuchtigkeitsausschluß eine Stunde ein mit TFA/Anisol gewaschener HBr-Strom so stark durch die Trifluoressigsäure geleitet, daß die Harzpartikel gut aufgewirbelt werden. Anschließend wurde die mit HBr gesättigte Trifluoressigsäure abgesaugt, das Harz noch 3 mal mit Trifluoressigsäure gewaschen, die vereinigten Trifluoressigsäurefiltrate i. V. bei 20 °C eingedampft, der Rückstand nochmals in Trifluoressigsäure gelöst und wieder eingedampft.
Der so erhaltene Rückstand wurde dann in wenig Trifluoressigsäure gelöst, das Peptid durch Zugabe einer ausreichenden Menge absoluten Äthers ausgefällt, abzentrifugiert, mit absolutem Äther säurefrei gewaschen und über KOH i. V. getrocknet.
Das so erhaltene Hydrobromid der SH-geschützten A-Ketten ist in dieser Form unbegrenzt haltbar und kann so zur Behandlung mit Na in flüssigem NH_3 (S-Bzl-geschützt) bzw. zur Sulfitolyse (S-Äthylmercapto-geschützt) eingesetzt werden.

2.2.6 Abspaltung der S-Benzylreste des Cysteins mit Na in flüssigem NH_3 [64]

Die Abspaltung der S-Benzyl-Schutzgruppen erfolgte in einer von S. HÖRNLE entworfenen Apparatur. Die S-Benzyl-geschützte A-Kette wurde in über Na destilliertem flüssigem NH_3 gelöst, zu dieser Lösung aus dem Nebengefäß der Apparatur so lange eine Lösung von Na in flüssigem NH_3 zugegeben, bis die Blaufärbung erhalten bleibt. Letztere wurde durch Zugabe von Ammoniumchlorid nach 1 min wieder entfernt, die Lösung durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuums eingefroren und lyophilisiert.

2.2.7 Sulfitolyse der ungeschützten bzw. als asymmetrisches Disulfid geschützten A-Ketten [64]

100 mg der mit Na in flüssigem NH_3 behandelten bzw. der als asymmetrisches Disulfid geschützten A-Kette wurden in 5 ml eiskaltem destilliertem Wasser suspendiert, der pH auf 9,2 eingestellt, 15 ml 0,2 m TRIS-Puffer pH 9,2, 500 mg Na_2SO_3 und 400 mg $Na_2S_4O_6$ zugegeben und 3 - 5 h bei 37 °C inkubiert.
Anschließend wurde diese Lösung über Nacht gegen destilliertes Wasser dialysiert (Visking-Dialysierschlauch 20/32), das Dialysat i. V. bei 20 °C unter Zugabe eines Tropfens 1-Octanol eingeengt und zur völligen Entsalzung über eine Säule mit Sephadex G 25 laufen gelassen (Puffer: 0,02 m NH_4CO_3, Absorptionsmessung bei 253 mu).

2.2.8 Reinigung der synthetischen A-Ketten nach S-Sulfonat-Gruppen [65, 66]

Zur Reinigung der synthetischen A-Ketten nach S-SO_3-Gruppen wurde DEAE-Sephadex A-25 in Acetat-Form verwendet. Hierzu wurde das käufliche DEAE-Sephadex A-25 2 x 5 min in 0,5 m HCl gerührt, mit dest. Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen, 2 x 20 min mit 1 N NaOH gerührt, wieder bis zur neutralen Reaktion mit dest. Wasser gewaschen, 2 x 30 min mit 1 N Essigsäure gerührt, mehrmals mit dest. Wasser gewaschen und anschließend in 8 m Harnstoff äquilibriert und entlüftet.

Mit dem so behandelten Ionenaustauscher wurde eine Säule von 1 cm Durchmesser und 12 cm Höhe gefüllt, 100 - 150 mg der zu reinigenden A-Kette in 2 - 3 ml 8 m Harnstoff gelöst, aufgetragen und nacheinander mit 0,03 m HCl in 8 m Harnstoff, 0,065 m HCl in 8 m Harnstoff, 0,135 m HCl in 8 m Harnstoff, 0,2 m HCl in 8 m Harnstoff und 0,3 m HCl in 8 m Harnstoff so lange eluiert, bis die bei jedem Puffer auftretenden Peaks im Schaubild wieder in eine ebene Linie übergingen.

Der mit 0,2 m HCl in 8 m Harnstoff eluierte Peak (Peak IV, Abb. 2, S. 33) läßt sich elektrophoretisch als Tetra-S-Sulfonat-A-Kette identifizieren (Abb. 3, S. 34).

Die Fraktionen dieses Tetra-S-SO_3-Peaks wurden vereinigt, mit NH_4HCO_3 neutralisiert, gegen dest. Wasser dialysiert, das Dialysat i. V. bei 20 °C unter Zugabe einiger Tropfen 1-Octanol auf etwa 20 ml eingeengt und über eine Säule mit Sephadex G-25 entsalzt.

Das bei der Entsalzung erhaltene Diagramm (Abb. 4, S. 35) zeigte, daß die so gereinigte synthetische A-Kette im Vergleich zur ungereinigten Kette (Abb. 1) ein einheitlicheres Molekulargewicht hatte.

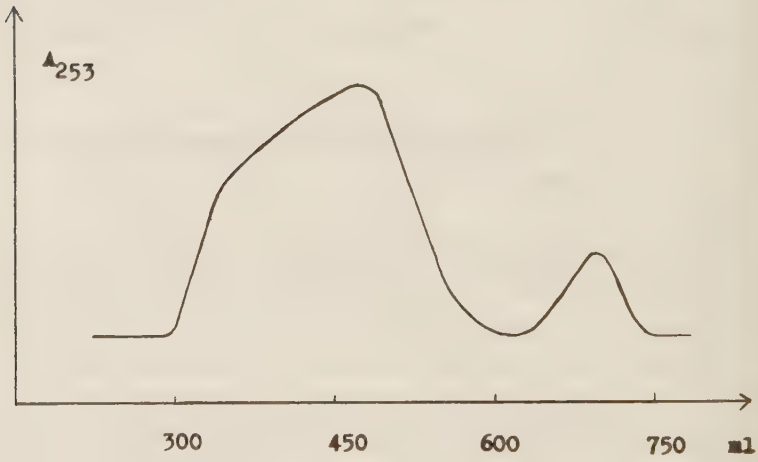


Abb. 1: Entsalzung einer synthetischen Insulin-A-Kette mittels einer Sephadex G-25 coarse Säule (100 x 4 cm). Puffer: 0,02 m NH_4HCO_3 Auftragevolumen: 20 - 50 ml Laufgeschwindigkeit: 150 ml/h

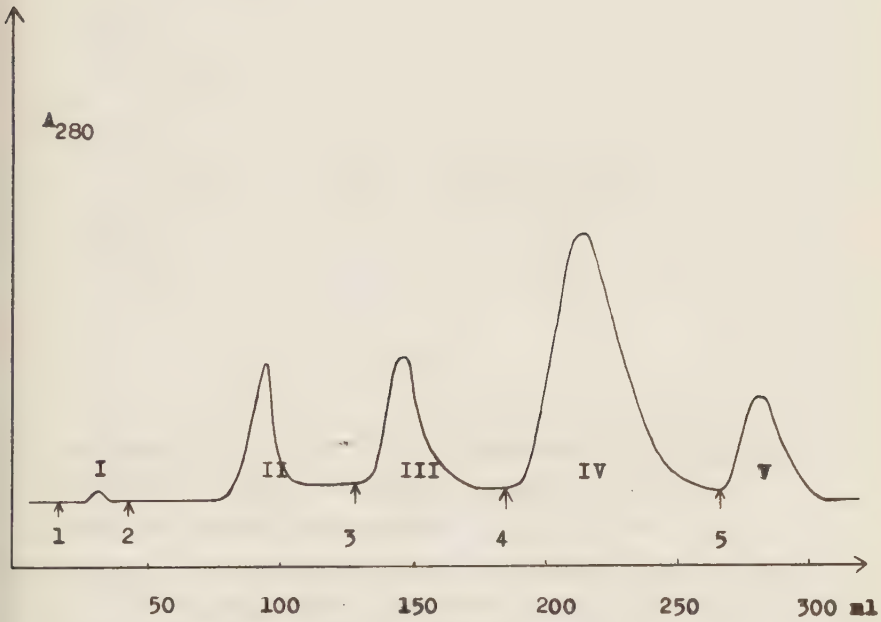


Abb. 2: Diagramm der A-Ketten-Reinigung mit DEAE-Sephadex A-25. Eluiert wurde bei Pfeil 1 mit 0, 03 m HCl in 8 m Harnstoff, ab Pfeil 2 mit 0, 065 m HCl in 8 m Harnstoff, ab Pfeil 3 mit 0, 135 m HCl in 8 m Harnstoff, ab Pfeil 4 mit 0, 2 m HCl in 8 m Harnstoff und ab Pfeil 5 mit 0, 3 m HCl in 8 m Harnstoff.

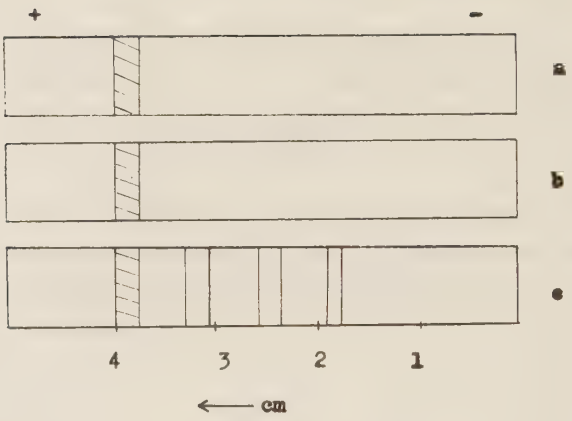


Abb. 3: Papierelektropherogramm der über DEAE-Sephadex gereinigten bzw. ungereinigten synthetischen Insulin-A-Ketten in 15%iger Ameisensäure, 10%iger Essigsäure in 4 m Harnstoff, pH 1,8. Anfärbung mit Paulys Reagenz, Laufzeit 8 h, angelegte Spannung 8 Volt/cm.

a = natürliche S-Sulfonat-A-Kette des Rinderinsulins

b = über DEAE-Sephadex gereinigte synthetische S-Sulfonat-A-Kette

c = ungereinigte synthetische S-Sulfonat-A-Kette

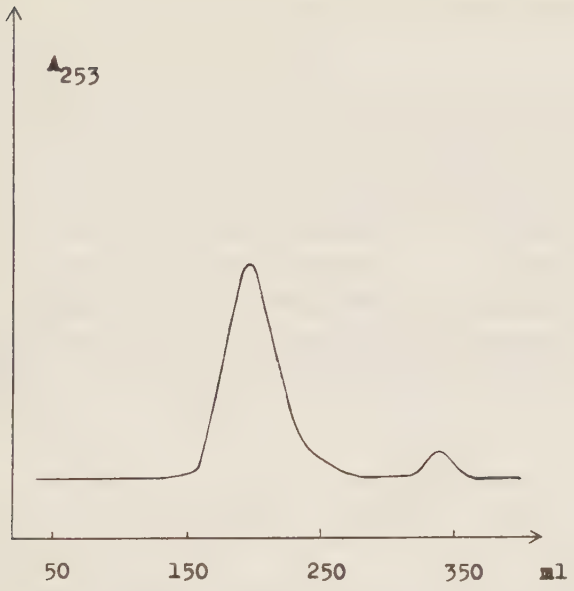


Abb. 4: Entsalzung der über DEAE-Sephadex A-25 gereinigten synthetischen Insulin-A-Kette mittels einer Sephadex G-25 Säule

2.2.9 Oxydative Sulfitolyse des Rinderinsulins [67, 68]

2 g Rinderinsulin wurden in 80 ml 0,2 m Phosphatpuffer pH 7,4 in 8 m Harnstoff gelöst, 2,8 g Na_2SO_3 und 1,4 g $Na_2S_4O_6$ zugegeben und 20 h bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde die Lösung in einem Visking-Cellulose-Schlauch 8 h gegen destilliertes Wasser dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde mit 1 N Essigsäure unter Eiskühlung auf pH 6,4 eingestellt, 10 min bei 0 °C stehengelassen und die ausgefallene S-Sulfonat-B-Kette abzentrifugiert. Die so erhaltene S-Sulfonat-B-Kette wurde mehrmals in etwa 150 ml destilliertem Wasser suspendiert, durch Zugabe einiger Tropfen 1 N Ammoniak gelöst und unter Eiskühlung mit 1 N Essigsäure bei pH 6,4 wieder ausgefällt.

2.2.10 Reinigung der Rinderinsulin-S-Sulfonat-B-Kette durch Ionenaustauschchromatographie [69, 70]

500 mg der oben erhaltenen Rinderinsulin-S-Sulfonat-B-Kette wurden in 3 ml 2,6 m Ameisensäure in 8 m Harnstoff gelöst und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Dowex 50 WX 2 Säule (H^+-Form, Abmessung 1,5 x 25 cm) aufgetragen. Das aufgetragene Protein wurde mit einem ansteigenden pH-Gradienten (je 150 ml 2,6 m Ameisensäure und 1 N Ammoniak in 8 m Harnstoff) eluiert, der bei pH 5,1 erhaltene Hauptpeak gut gegen dest. Wasser dialysiert, lyophilisiert, nochmals in 25 ml ammoniakalischem Wasser gelöst, bei pH 6,0 wieder ausgefällt, abzentrifugiert, der Niederschlag in wenig Wasser gelöst und lyophilisiert.

Ausbeute: 260 mg = 52 % d. Th.

2.2.11 Rekombination der synthetischen A-Ketten mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette [71]

10 mg Tetra-S-Sulfonat-A-Kette wurden in einem kleinen Kutscher-Steudel-Gefäß mit seitlichem Gaseinleitungsrohr in 2,5 ml mit N_2 belüftetem bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert dieser Lösung auf 5,0 eingestellt, 0,5 ml 1 m wäßrige Mercaptoäthanollösung zugegeben und von nun an immer ein schwacher N_2-Strom durch diese Lösung geleitet. Nach 5 min wurde das Gefäß in einem siedenden Wasserbad 6 min erhitzt, anschließend auf 0 °C abgekühlt und unter Eiskühlung mit Essigester extrahiert. Im Destillationskolben befanden sich hierbei 10 - 20 g Blei-II-acetat, das zur Ausfällung des Mercaptoäthanols diente.
Nach 3stündiger Extraktion wurde das Gefäß abgenommen, der N_2-Strom kurz unterbrochen, die Essigesterphase mittels einer Kapillare abgesaugt und der restliche Essigester durch Einleiten eines kräftigen N_2-Stromes entfernt. Da hierbei nach einiger Zeit die Proteinsuspension stark schäumt, wurde das Extraktionsgefäß ge-

kippt und der N_2-Strom über die Flüssigkeitsoberfläche geleitet. Nachdem der Essigester entfernt war, wurde der N_2-Strom abgestellt, die Suspension in ein kleines Gefäß, in dem sich 2,5 mg Rinderinsulin-SSO_3-B-Kette befanden, gegeben, das Kutscher-Steudel-Gefäß nochmals mit 1 ml bidest. Wasser ausgespült, die Suspension mit 0,1 N NaOH auf pH 10,6 eingestellt, 1,4 ml 0,1 m Na-Glycinat Puffer pH 10,6 zugegeben und über Nacht bei Luftzutritt gerührt.

Die Rekombinationslösung wurde dann mit 0,1 m HCl auf pH 7 - 7,5 eingestellt und mit 1,8%iger NaCl-Lösung auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung enthält, bezogen auf die eingewogenen 2,5 mg Rinderinsulin-B-Kette bei 100%iger Rekombination, 4 mg Insulin.

2.3 Biologischer Test zur Aktivitätsbestimmung der Hybridinsuline

Als biologischer Test zur Ermittlung der Aktivität der Rekombinate wurde der Mäusefalltest [72] verwendet. Die zum Test benötigten Mäuse (Gewicht: 16 - 24 g) wurden 30 h vor Testbeginn nüchtern gesetzt und 1 h vor Versuchsbeginn in den auf die Testtemperatur von 30 °C vorgewärmten Raum gebracht.

Den Mäusen wurde nun in 10er Gruppen intraperitonial eine bestimmte Menge des Rekombinats injiziert; die Tiere wurden anschließend in einen schräggestellten, langsam rotierenden Zylinder aus engmaschigem Draht gesetzt. Nach 8 min wurde ein Nullwert abgelesen; alle bis dahin heruntergefallenen Mäuse wurden wieder in den Zylinder zurückgesetzt. Nach 20 - 30 min begann die Insulinwirkung. Infolge der Blutzuckersenkung beginnen sich die Muskeln der Versuchstiere zu verkrampfen, diese sind nun nicht mehr in der Lage, sich festzuhalten und fallen herunter. Nach 60 min wurde die Anzahl der in den einzelnen Gruppen herabgefallenen Mäuse abgelesen und die Aktivität anhand einer Eichkurve (Abb. 5, S. 38) bestimmt.

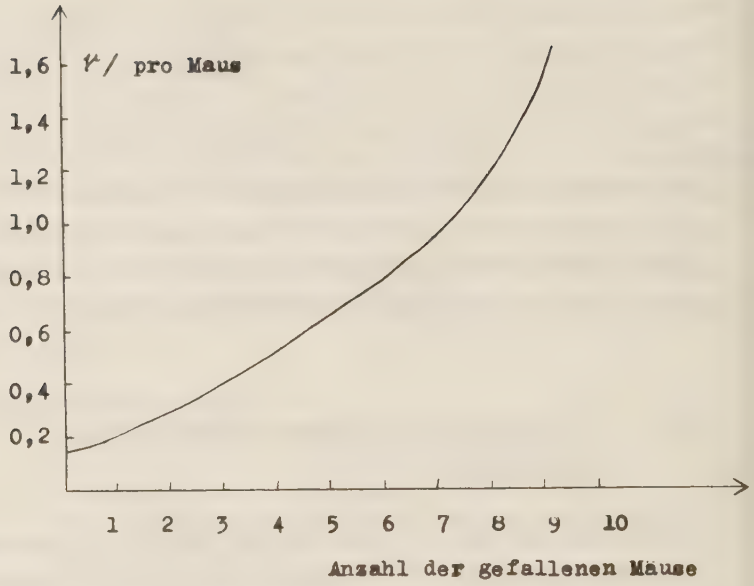


Abb. 5: Eichkurve zur Ermittlung der biologischen Aktivitäten der halbsynthetischen Insuline.
Abszisse: Anzahl der herabgefallenen Mäuse
Ordinate: γ-Rinderinsulin, die pro Maus injiziert wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Schutzgruppen

Die α-Aminogruppe aller Aminosäuren wurde für die Ankondensation mittels der N-t-BOC-Schutzgruppe blockiert.
Die Hydroxylgruppen des Serins und Tyrosins wurden als Benzyläther geschützt.
Die ß- bzw. γ-Carboxylgruppen der Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure wurden für den Verlauf der Synthese als Benzylester geschützt.
Zum Schutz der SH-Gruppe des Cysteins dienten die S-Benzyl-, S-Äthyl-mercapto- und S-Benzyl-mercapto-Schutzgruppen. Welche der hier aufgezählten SH-Schutzgruppen man bei den jeweiligen Synthesen benutzte, wird in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

3.2 Reinheitskriterien der Aminosäurenderivate

Als Reinheitskriterien der zur Synthese verwendeten Aminosäuren dienten zunächst deren Schmelzpunkte und Drehwerte. Ferner wurde dünnschichtchromatographisch geprüft, ob die N-t-BOC-Derivate, Benzyläther und Benzylester keine freien Aminosäuren mehr enthielten.
Zur Prüfung der Einheitlichkeit der N-t-BOC-Derivate trifunktioneller Aminosäuren wurde ein weiteres Chromatogramm nach Abspaltung des N-t-BOC-Restes mittels 1 N HCl in Eisessig angefertigt.

3.3 Schema der synthetisierten Insulin-A-Ketten

AS.	nat.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
2	Ile			Val														
3	Val																	
4	Glu												Asp					
5	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu				Asp				Glu	Glu	Glu
6	Cys																	
7	Cys																	
8	Ala																	
9	Gly																	
10	Val						Ala	Ala										
11	Cys																	
12	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala		Ala	Ala	Ala	Ala			Ala	Ala	Ala
13	Leu																	
14	Tyr						Ala	Ala								Ala		
15	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu			Asp					Glu		
16	Leu																	
17	Glu										Asp							
18	Asn	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala		Ala	Ala	Ala	Ala			Ala	Ala	Ala
19	Tyr	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe		Phe	Phe	Phe	Phe			Phe		
20	Cys																	
21	Asn	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Asn	Ala	Ala	Ala

3.4 Synthesen der Insulin-A-Ketten

3.4.1 Allgemeines

Als Sequenz der natürlichen Bezugs-A-Kette wurde die des Schafinsulins zugrunde gelegt.

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen A-Ketten sind mit den jeweiligen Zahlen aus dem Schema 3.3 (S. 40) bezeichnet.
Aus diesem Schema kann auch die Sequenz der Ketten entnommen werden. Die jeweiligen Ausbeuten, Aminosäurenanalysen und biologischen Aktivitäten der Rekombinate sind in den Tabellen zusammengefaßt. (Tab. 1 - 4, S. 55 - 60)
Alle synthetisierten A-Ketten wurden zur Bestimmung der biologischen Aktivität mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette rekombiniert. Diese B-Kette besaß keine Eigenaktivität mehr.

Insulin-A-Ketten-Synthesen

3.4.2 A-Ketten 1 - 3

Die Darstellung dieser A-Ketten sollte dazu dienen, Erfahrungen mit der Peptidsynthese am Festkörper nach Merrifield zu sammeln. Als Sequenz wurde die einer von WEBER [18] durch Fragmentkondensation synthetisierten A-Kette gewählt, um bei der Testung der Rekombinate einen Vergleichswert für die biologischen Aktivitäten und somit für den Verlauf der Synthese zu haben.
Die SH-Gruppe des Cysteins wurde bei dieser Synthese als Benzylthioäther geschützt.
Zur Kupplung der einzelnen Aminosäuren wurden die jeweiligen p-Nitrophenylester der N-t-BOC-geschützten Aminosäuren verwendet, nur von Valin wurde der entsprechende Hydroxysuccinimidester eingesetzt.

Das Trägerharz hatte eine Beladung von 0, 45 mMol N-t-BOC-ala pro Gramm Harz.

Die Kupplungsreaktionen wurden in DMF bei 4fachem Überschuß und einer Konzentration von 0, 3 Mol/l Lösungsmittel an dem zur Reaktion eingesetzten Aminosäurederivat durchgeführt. Die Reaktionszeit lag zwischen 24 und 30 Stunden.

Eine Hydrolyse des Teilstückes A21 - A11 ergab eine befriedigende Aminosäurenanalyse, wogegen die Hydrolysen der gesamten Ketten 1 - 3 zeigten, daß die aktivierten Ester von Isoleucin, Glycin und Valin sehr schlecht reagiert hatten.

Das aminoendständige Glycin der Kette 1 wurde als N-Acetyl-glycin-ONp angekuppelt, wodurch eine am Aminoende acetylierte A-Kette erhalten wurde. Da die N-Acetyl-Schutzgruppe auch gegen Na in flüssigem NH_3 stabil ist, bleibt auch die S-Sulfonat-Kette am Aminoende acetyliert.

Parallel zu Kette 1 wurde eine A-Kette mit derselben Sequenz, aber freier endständiger Aminogruppe synthetisiert (Kette 2). Ein Vergleich der biologischen Aktivitäten der Rekombinate beider A-Ketten zeigte keinen Unterschied, jedoch waren die erhaltenen Werte zu gering, um eine genauere Aussage zu erlauben.

Mit der Kette 3 sollte die Möglichkeit eines Austausches von Isoleucin in A2 gegen Valin [17] überprüft werden. Das Rekombinat dieser A-Kette besaß keine biologische Aktivität, was jedoch keinen Rückschluß auf diesen Austausch zuläßt, da die Qualität dieser Kette aufgrund der schlechten Umsatzraten des N-t-BOC-valin-hydroxy-succinimidesters völlig unbefriedigend war.

Die Ausbeuten bei allen bisher beschriebenen A-Ketten waren gering. Die erhaltenen S-Sulfonat-A-Ketten erwiesen sich elektrophoretisch zudem als völlig uneinheitlich, so daß bei diesen A-Ketten auf eine Reinigung verzichtet wurde.

3.4.3 A-Kette 4

Bei dieser Synthese sollten die Ergebnisse einer Arbeit von WEIGAND und OBERMEIER [73] angewendet werden. Die Autoren untersuchten die Umsatzraten von Aminosäuren, welche als Hydroxy-succinimid-ester aktiviert waren, bei der Festkörper-Peptidsynthese.
Sie konnten zeigen, daß eine längere Reaktionszeit und eine Erneuerung des Reaktionsmediums einen erhöhten Reaktionsumsatz bewirkt.
Als Sequenz wurde die der Kette 2 beibehalten. Die Beladung des Harzes lag bei 0,45 mMol N-t-BOC-ala pro Gramm Harz. Die SH-Gruppen des Cysteins wurden als Benzyl-thioäther geschützt.

Die Synthese wurde zunächst unter Verwendung von p-Nitrophenyl-estern durchgeführt, Valin wurde wieder als Hydroxy-succinimid-ester eingesetzt. Bei 2fachem Überschuß und einer Konzentration von 0,25 Mol AS-ONp/l Lösungsmittel wurde 24 h reagieren lassen, anschließend 4 mal mit DMF ausgewaschen und nochmals bei 4fachem Überschuß und einer Konzentration von 0,5 Mol AS-ONp pro l Lösungsmittel derselben Aminosäure 48 Stunden, bei Valin 72 Stunden umgesetzt.

Eine Hydrolyse des Teilstückes A21 - A8 zeigte, daß auch unter diesen Bedingungen bei den Aminosäuren Glycin und Valin nur eine Umsatzrate von ca. 60 - 70 % erzielt wurde. Aus diesem Grund wurden die letzten 3 Aminosäuren Valin, Isoleucin und Glycin mittels DCCI angekuppelt. Hierbei wurde mit 4fachem Überschuß, einer Konzentration von 0,3 - 0,4 Mol N-t-BOC-AS/l Lösungsmittel und einer Reaktionszeit von 2 Stunden gearbeitet.
Die S-Bzl-geschützte Kette und die S-Sulfonatkette wurden in guten Ausbeuten erhalten. Die biologische Aktivität des Rekombinats der S-Sulfonat-Kette lag etwa doppelt so hoch als bei der Vergleichskette 2. Bei der Reinigung der S-Sulfonat-Kette 4 auf S-SO_3-Gruppen über DEAE-Sephadex konnte die biologische Aktivität nochmals um das Doppelte gesteigert werden.
Die Ausbeute an gereinigter A-Kette war jedoch schlecht. Eine Erklärung für die niedere biologische Aktivität läßt sich aus den Be-

funden über die schädigende Wirkung der Behandlung der geschützten A-Kette mit Na in flüssigem NH_3 geben, welche zur Abspaltung der S-Bzl-Schutzgruppe des Cysteins notwendig ist [64, 65, 75, 76].

Danach wird bei der Einwirkung von Na in flüssigem NH_3 auf die A-Kette ein Teil des Glycins in A1 abgespalten. Eine A-Kette mit fehlendem Glycin in A1 ist inaktiv [14, 77].
Ferner wird ein Teil der Cysteine bei Einwirkung von Na in flüssigem NH_3 entschwefelt, was sich durch relativ geringe Ausbeuten bei der oben angewandten Reinigungsmethode für die A-Kette äußert.

Da eine fehlende Aminosäure im Verlauf der A-Kette ebenfalls deren Inaktivierung bewirkt [78], dürfte die massive Fehlstelle bei Val A10 und Gly A9 ebenfalls zu der schlechten biologischen Aktivität beigetragen haben.

3.4.4 A-Kette 5

Bei dieser Synthese wurde in dieser Arbeit die SH-Gruppe des Cysteins erstmals als asymmetrisches Äthyl-Disulfid geschützt [79].
Die Schutzgruppe erwies sich für eine p-Nitrophenylestersynthese als ungeeignet [80], daher wurde die Ankondensation der einzelnen Aminosäuren mit DCCI durchgeführt.

Bei einer Harzbeladung von 0,45 mMol N-t-BOC-ala pro Gramm Harz wurden die anzukondensierenden Aminosäuren in 5fachem Überschuß, einer Konzentration von 0,4 Mol/l Lösungsmittel bei einer Reaktionszeit von 2 Stunden eingesetzt. Anschließend wurde das Harz 3 x mit CH_2Cl_2, 3 x mit Äthanol und 3 x mit CH_2Cl_2 gewaschen und die Anknüpfungsreaktion nochmals unter gleichen Bedingungen wiederholt.

Die Hydrolyse des Teilstückes A21 - A8 zeigte eine Verbesserung in der Aminosäurenzusammensetzung gegenüber der entsprechenden Hydrolyse von A-Kette 4.

Die erzielten Ausbeuten an geschützten und S-Sulfonat-A-Ketten

lagen gegenüber der vorher mit S-Bzl-Schutz synthetisierten A-Kette 4 etwas niedriger. Die Ausbeute an über DEAE-Sephadex gereinigter Kette konnte jedoch gesteigert werden.
Die biologische Aktivität der Rekombinate dieser Kette erfuhr dagegen keine Steigerung gegenüber den entsprechenden Rekombinaten der A-Kette 4.

3.4.5 A-Ketten 6 und 7

In diesen A-Ketten wurden als weitere Variationen Valin in A10 und Tyrosin in A14 gegen Alanin ausgetauscht, da bei vorhergegangenen Synthesen von A-Ketten, in denen diese Variationen ebenfalls enthalten waren [36, 78], noch biologisch aktive Rekombinationsprodukte erhalten wurden.
Zum Schutz der SH-Gruppen des Cysteins wurde bei diesen Ketten die S-Äthyl-mercapto-Gruppe verwendet.
Die Synthese von A-Kette 6 wurde analog der von A-Kette 5 durchgeführt. Nach zweimaliger Kupplung der Aminosäuren mit DCCI wurde jedoch nochmals mit 6fachem Überschuß an Eisessig und DCCI umgesetzt, um eventuell noch freie Aminogruppen für die weitere Synthese zu blockieren und so Fehlsequenzen in der vollständigen A-Kette zu vermeiden. Die acetylierten Stümpfe bis zu Cystein in A7 müßten dann bei der Reinigung auf S-SO_3-Gruppen über DEAE-Sephadex entfernt werden können.

Die Ausbeuten an geschützter und S-Sulfonat-Kette waren bei dieser Synthese sehr gut, die biologische Aktivität der Rekombinate war jedoch enttäuschend.

Daraufhin wurde die Synthese der A-Kette nur mit einmaliger Kupplung der Aminosäuren mit DCCI durchgeführt (A-Kette 7). Die Acetylierung der freien Aminogruppen wurde ebenfalls weggelassen. Die letzten drei Aminosäuren wurden in 7,5fachem Überschuß bei einer Konzentration von 0,7 Mol N-t-BOC-AS/l Lösungsmittel eingesetzt. Die Reaktionszeit wurde bei 2 h belassen. Auch bei dieser Kette konnten sowohl die geschützte Kette als auch die S-Sulfonat-

Kette in befriedigender Ausbeute erhalten werden.

Die biologische Aktivität des Rekombinats der S-SO_3-A-Kette 7 war dreimal so hoch als die von Kette 6.

Eine Überraschung trat bei der Bestimmung der biologischen Aktivitäten der Rekombinationen der über DEAE-Sephadex gereinigten A-Ketten 6 und 7 ein. Beide Rekombinationen waren gleich aktiv, zudem ergab die Kette 6 bei der Reinigung die bessere Ausbeute. Daraufhin wurde nochmals die biologische Aktivität eines Rekombinats mit ungereinigter A-Kette 6 bestimmt; hierbei bestätigte sich jedoch das oben erhaltene Ergebnis.

3.4.6 A-Kette 8

Diese A-Kette wurde mit der Sequenz des natürlichen Schafinsulins synthetisiert. Cystein wurde als N-t-BOC-S-äthyl-mercapto-cys in der Synthese eingesetzt.
Das Harz war mit 0,26 mMol N-t-BOC-asn pro Gramm beladen, die Kupplung der Aminosäuren erfolgte mit DCCI bei fünffachem Überschuß und einer Konzentration von 0,4 Mol AS/l Lösungsmittel bei einer Reaktionszeit von 2 h. Asparagin und Glutamin wurden als p-Nitrophenylester zur Synthese eingesetzt. Diese beiden Aminosäuren wurden bei 6fachem Überschuß und einer Konzentration von 0,6 Mol/l Lösungsmittel 24 h in DMF reagieren lassen.
Der N-t-BOC-Rest wurde nach jedem Syntheseschritt mit 50 %iger Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 abgespalten; damit sollte die bei Gln in A15 und A5 auftretende Bildung von Pyroglutaminsäure bei Verwendung von 1 N HCl in Eisessig [28] vermieden werden.
Bei den Abspaltungen des N-t-BOC-Restes trat eine starke Orangefärbung des Trägerharzes auf, die nicht erklärt werden konnte.

Die Ausbeuten waren bei dieser A-Kette schlecht. Die biologischen Aktivitäten der Rekombinate lagen nicht höher als bei den vorangegangenen hochvariierten A-Ketten. Diese Ergebnisse waren enttäuschend. Da es nicht auszuschließen war, daß sie auf der Abspaltung

des N-t-BOC-Restes mit Trifluoressigsäure beruhten, wurde diese Abspaltungsmethode nicht mehr angewendet.

3.4.7 A-Ketten 9 - 12

Anhand dieser A-Ketten sollte untersucht werden, ob ein Austausch der Glutaminsäuren bzw. Glutamine der A-Ketten gegen Asparaginsäure ohne Wirkungsverlust möglich ist.
Weiterhin sollte an diesen A-Ketten versucht werden, durch Erhöhung der Konzentration an den zur Reaktion gebrachten Aminosäuren eine Verbesserung der Syntheseergebnisse zu erreichen.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der Ersatz obiger Aminosäuren (Gln A5 und A15) durch Alanin zu einem weitgehenden Wirkungsverlust führt [16], ein Austausch der Glutamine in A15 bzw. A5 gegen Glutaminsäure [18] jedoch ohne Minderung möglich ist, sollte hier nun untersucht werden, wie sich die Verkürzung des Glutamins bzw. des Glutaminsäuremoleküls um eine Methylengruppe auf die biologische Aktivität des Hormons auswirkt. Sollten diese Ketten nach Rekombination noch biologische Aktivität zeigen, so ist anzunehmen, daß hierzu nur die freie Carboxylgruppe, nicht jedoch das gesamte Molekül des Glutamins bzw. der Glutaminsäure nötig ist.

Als Schwefelschutzgruppe des Cysteins diente bei diesen Synthesen wiederum die S-Äthyl-mercapto-Gruppe.

Das verwendete Trägerharz war mit 0,45 mMol N-t-BOC-ala pro Gramm beladen. Die Aminosäuren wurden bis auf Glutamin mittels DCCI ankondensiert, zur Verknüpfung letzterer diente die p-Nitrophenylestermethode. Bei der DCCI-Ankondensation wurden die Aminosäuren in 7,5fachem Überschuß bei einer Konzentration von 0,6 - 0,8 Mol AS/l Lösungsmittel eingesetzt. Die p-Nitrophenylester des Glutamins wurden in 10fachem Überschuß und einer Konzentration von 0,8 Mol/l Lösungsmittel zur Reaktion gebracht. Die Reaktionszeiten betrugen 2 bzw. 24 Stunden bei der DCCI- bzw. p-Nitrophenylestermethode.

Die Verwechslung der Synthesegefäße der A-Ketten 9 und 10 führte dazu, daß in Kette 9 kein Gln bzw. Glu gegen Asp ausgetauscht wurde, in Kette 10 jedoch sowohl Glu in A17 als auch Gln in A15.

Das Rekombinat der A-Kette 10 besaß zwar noch eine biologische Aktivität, diese betrug jedoch nur etwa ein Viertel der Aktivität der Vergleichskette 9, so daß keine genaue Aussage über diese Variationen in Kette 10 gemacht werden konnten.

Der Austausch von Gln in A5 gegen Asparaginsäure erbrachte keine Verminderung der biologischen Aktivität gegenüber der Vergleichskette 9, während bei dem Ersatz von Glu in A4 durch Asp die biologische Aktivität des Rekombinats auf etwa die Hälfte der Aktivität der Vergleichskette 9 absank. Letzteres läßt jedoch keinen eindeutigen Schluß darauf zu, daß nicht auch Glu in A4 gegen Asp ausgetauscht werden kann, da in dieser Kette 12 bei der Abspaltung des N-t-BOC-Restes mit 1 N HCl in Eisessig bei Gln in A5 Pyroglutaminsäure entsteht, was zu einem Kettenabbruch führen kann.
Diese Annahme wurde bei Prüfung der biologischen Aktivitäten der Rekombinate mit den über DEAE-Sephadex gereinigten Ketten 11 und 12 bekräftigt. Während bei den ungereinigten Ketten die biologische Aktivität des Rekombinats von A-Kette 11 mehr als doppelt so hoch war als die des Rekombinats der A-Kette 12, verhielten sich die biologischen Aktivitäten der Rekombinate dieser beiden A-Ketten nach deren Reinigung nurmehr 1,5 zu 1.

Die Ausbeuten der A-Ketten 9 - 12 waren bis auf die der A-Kette 11 nicht befriedigend. Es gelang jedoch, durch die Erhöhung der Aminosäurenkonzentration biologisch hochwertigere A-Ketten zu erhalten. Wieweit die Reduzierung der Variationen an diesem Ergebnis beteiligt war, ist nicht sicher. Durch eine weitere Konzentrationserhöhung im Reaktionsmedium bei den später synthetisierten A-Ketten 16 und 17 wurden mit deren Rekombinate noch bessere Ergebnisse erzielt, was dafür spricht, daß vor allem die Erhöhung der Aminosäurekonzentration im Reaktionsmedium entscheidend zur Verbesserung der Qualität der synthetisierten A-Ketten beitrug.

3.4.8 A-Ketten 13 und 14

Die Synthese dieser beiden A-Ketten mit der Sequenz der Schafinsulin-A-Kette wurde zum Vergleich des Schutzes der SH-Gruppe des Cysteins mittels eines asymmetrischen Disulfides (A-Kette 13) bzw. der S-Benzyl-Schutzgruppe (A-Kette 14) durchgeführt. Als asymmetrisches Disulfid wurde das S-Benzyl-mercapto-disulfid des Cysteins verwendet.

Die Aminosäuren wurden bis auf Asn und Gln mittels DCCI ankondensiert, letztere wurden als p-Nitrophenylester zur Reaktion gebracht. Da die Harzbeladung nur bei 0,16 mMol N-t-BOC-asn pro Gramm Trägerharz lag, konnte trotz eines 10fachen Überschußes an der jeweiligen zur Reaktion gebrachten Aminosäure nur eine Konzentration von 0,5 - 0,7 Mol AS/l Lösungsmittel erreicht werden.
Die Ausbeuten an geschützten A-Ketten waren sehr unterschiedlich. Während bei der S-Bzl-geschützten Kette 14 die gute Ausbeute von 64 % erreicht wurde, konnten bei der Kette 13 nur 10 % des Peptids vom Trägerharz abgespalten werden.

Bei diesen beiden A-Ketten zeigte sich nun besonders deutlich, wie hoch die Verluste bei Abspaltung der S-Bzl-Schutzgruppe mit Na in flüssigem NH_3 sind. Die sechsfach höhere Ausbeute an S-Bzl-geschützter A-Kette schrumpfte auf eine dreimal so hohe bei der ungereinigten S-Sulfonat-A-Kette und auf eine etwa doppelt so hohe bei der über DEAE-Sephadex gereinigten S-Sulfonat-Kette zusammen. Dabei verhielten sich die biologischen Aktivitäten der Rekombinate dieser A-Ketten gerade umgekehrt wie deren Ausbeuten.
Die während der Synthese als asymmetrisches Disulfid geschützte A-Kette 13 lieferte sowohl bei den Rekombinaten mit deren ungereinigter als auch gereinigter S-SO_3-A-Kette doppelt so hohe biologische Aktivitäten als die entsprechenden Rekombinate mit A-Kette 14. Dies bedeutet, daß die Ausbeuten an intakter A-Kette bei beiden Ketten etwa gleich groß sind.

3.4.9 A-Kette 15

Mit dieser A-Kette sollte die Leistungsfähigkeit einer gemischten p-Nitrophenylester- und DCCI-Synthese bei Einsatz eines hohen Überschußes und hoher Konzentration an der zur Reaktion gebrachten Aminosäure untersucht werden. Da der Schutz der SH-Gruppe des Cysteins als asymmetrisches Disulfid bei der p-Nitrophenylestersynthese nicht empfehlenswert ist, wurde bei dieser Synthese auf die S-Bzl-Schutzgruppe zurückgegriffen. Als Sequenz dieser A-Kette wurde die einer von WEBER synthetisierten A-Kette gewählt [36], bei der S-Äthyl-mercapto-cystein als geschütztes Cysteinderivat zur Synthese eingesetzt wurde.

Die Aminosäuren Valin, Isoleucin und Glycin wurden bei 10fachem Überschuß, einer Konzentration von 0,7 Mol AS/l Lösungsmittel und einer Reaktionszeit von 2 h angekuppelt. Alle anderen Aminosäuren wurden bei gleichem Überschuß und gleicher molarer Konzentration als p-Nitrophenylester 48 Stunden reagieren lassen. Sowohl die Ausbeuten als auch die biologischen Aktivitäten der Rekombinate waren entsprechend den Werten der von WEBER mit S-Äthyl-mercapto-cystein und der DCCI-Methode synthetisierten A-Kette gleicher Sequenz. Da der Material- und Arbeitsaufwand bei der letzteren Kette erheblich niedriger war, ist allein von diesem Gesichtspunkt der A-Kettensynthese am Festkörper mit asymmetrischem Disulfid-SH-Schutz des Cysteins gegenüber der Synthese mit S-Bzl-Schutz der Vorzug zu geben.

3.4.10 A-Ketten 16 und 17

Bei diesen A-Ketten sollten die S-Äthyl-mercapto- und S-Benzyl-mercapto-Schutzgruppen des Cysteins unter genau gleichen Synthesebedingungen miteinander verglichen werden.
Das verwendete Trägerharz war mit 0,45 mMol N-t-BOC-ala pro Gramm verestert. Die Aminosäuren wurden bis auf Glutamin mittels DCCI angekuppelt, letzteres wurde als p-Nitrophenylester zur Reaktion eingesetzt.

Die Aminosäurenderivate von Alanin, Cystein und Glutaminsäure wurden in 10fachem Überschuß bei einer Konzentration von 0, 7 Mol AS/l Lösungsmittel eingesetzt. Bei Tyrosin bzw. Glycin, Isoleucin und Valin betrug der Überschuß das 15- bzw. 20fache und die Konzentration 1 bzw. 1, 2 - 1, 4 Mol AS/l Lösungsmittel. Die Reaktionsdauer war 2 Stunden.

N-t-BOC-gln-ONp wurde in 15fachem Überschuß bei einer Konzentration von 1 Mol AS/l DMF 36 Stunden umgesetzt.

Bei dieser Synthese wurde DMF, im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Synthesen, nur noch als Lösungsmittel bei der Reaktion des N-t-BOC-Gln-ONp eingesetzt. Die Deprotonisierung der α-Aminogruppe mit TÄA wurde in CH_2Cl_2 als Lösungsmittel durchgeführt.

Beide A-Ketten konnten sowohl in ihrer geschützten Form als auch in der S-SO_3-Form und nach Reinigung letzterer über DEAE-Sephadex in befriedigenden Ausbeuten erhalten werden.
Die biologischen Aktivitäten der Rekombinate dieser A-Ketten zeigten etwa die gleichen Werte, so daß man sagen kann, die beiden verwendeten SH-Schutzgruppen des Cysteins sind gleichwertig.

A-Kette 16 wurde zur Anreicherung des Hybridinsulins mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette verwendet.

3.5 Anreicherung eines halbsynthetischen Hybridinsulins

5 Rekombinationen aus 20 mg synthetischer A-Kette 16 und 10 mg Rinderinsulin-B-Kette wurden nach Beendigung der Rekombination mit 0, 1 N HCl auf pH 7 - 7, 5 eingestellt, i. V. bei 20 °C unter Zugabe einiger Tropfen 1-Octanol auf etwa 15 ml eingeengt, 8 g Harnstoff p.a. zugegeben und unter Rühren und Eiskühlung mit Eisessig auf pH 2 angesäuert. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert, 3 mal mit 1 N Essigsäure in 8 m Harnstoff ausgewaschen und die vereinigten Harnstofflösungen gegen 0, 3 m Essigsäure dialysiert. Während der Dialyse fiel ein Teil des Proteins wieder aus,

dieses wurde nach Beendigung der Dialyse abzentrifugiert, 3 mal mit 1 N Essigsäure ausgewaschen und die vereinigten Überstände i. V. bei 20 °C unter Zugabe eines Tropfens 1-Octanol auf etwa 5 ml eingeengt. Diese Proteinlösung wurde auf eine mit Sephadex G-50 super fine gefüllte Säule aufgetragen und mit 1 N Essigsäure eluiert (Abb. 6).

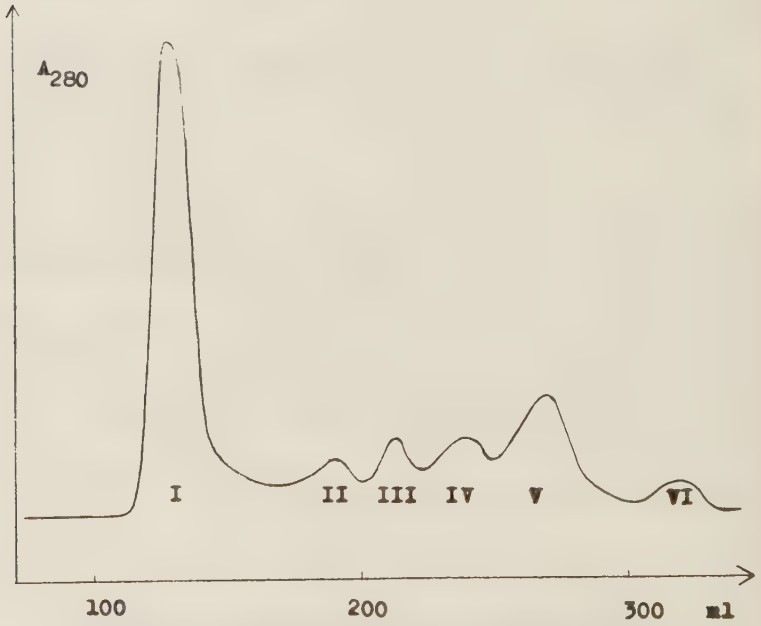


Abb. 6: Elutionsdiagramm der nach obigem Verfahren erhaltenen Proteinlösung aus Rekombinationen synthetischer A-Kette 16 mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette.
Säulenmaße: Durchmesser 2 cm, Füllhöhe 120 cm
Säulenfüllung: Sephadex G-50 super fine
Auftragevolumen: 9 ml
Elutionsmittel: 1 N Essigsäure
Elutionsgeschwindigkeit: 20 ml/h

Peak I enthält A- und B-Kettenpolymere, biologisch inaktiv.

Peak II Gemisch aus A- und B-Ketten, biologisch inaktiv, elektrophoretisch nicht identifizierbar.

Peak III In diesem Peak ist die Hauptmenge des Hybridinsulins enthalten. Die biologische Aktivität dieses Produkts betrug 75 % der des kristallinen Rinderinsulins (bezogen auf Proteineinwaage). Die erhaltene Ausbeute von 10 mg Hybridinsulin entsprach etwa 50 % der theoretisch zu erwartenden Ausbeute.

Die saure Hydrolyse des in Peak III enthaltenen Proteins ergab in der Aminosäurenanalyse folgende Zusammensetzung: Asp 1, 01 (1), Ala 6, 15 (6), Arg 0, 93 (1), Cys 4, 64 (6), Glu 7, 0 (7), Gly 4, 85 (5), Ile 0, 93 (1), His 1, 86 (2), Leu 5, 95 (6), Lys 0, 97 (1), Phe 2, 74 (3), Ser 0, 47 (1), Thre 0, 68 (1), Tyr 2, 30 (4), Pro 1, 01 (1), Val 4, 68 (5). Die in Klammern angegebenen Zahlen sind die errechneten Werte. Als Bezugsaminosäure diente Glu.

Peak IV enthält ein Gemisch aus A- und B-Kette, elektrophoretisch völlig uneinheitlich, geringe biologische Aktivität, die wahrscheinlich durch unvollständige Abtrennung des Peaks III bedingt ist.

Peak V besteht aus reiner monomerer A-Kette 16. Aminosäurenanalyse: Ala 3, 90 (1), Cys 2, 98 (4), Glu 4, 00 (4), Gly 2, 05 (2), Ile 0, 85 (1), Leu 2, 11 (2), Tyr 1, 40 (2), Val 1, 86 (2). Die theoretischen Werte sind in Klammer angegeben. Bezugsaminosäuren waren Leu und Glu entsprechend den anderen Aminosäurenanalysen.

Peak VI Salzpeak.

Versuche, das gesamte Protein in 1 N Essigsäure in 8 m Harnstoff direkt über eine Sephadex G-50 super fine Säule zu fraktionieren, schlugen fehl. Bei Ansäuern der Rekombinate ohne Harnstoffzugabe wurde dasselbe negative Ergebnis erzielt.

In beiden Fällen wurden nur die Peaks IV, V und VI des Elutionsdiagramms in Abb. 6 erhalten. Bei ersterem Versuch fiel außerdem der größte Teil des Proteins wie erwartet auf der Säule aus, so daß diese für weitere Trennungen unbenutzbar wurde.

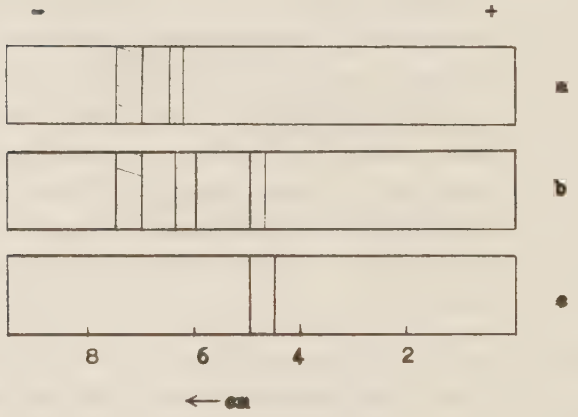


Abb. 7: Papierelektropherogramm des angereicherten Hybridinsulins in 15%iger Ameisensäure, 10%iger Essigsäure in 4 m Harnstoff, pH 1,8. Anfärbung mit Paulys Reagenz, Laufzeit 8 h, angelegte Spannung 8 Volt/cm.

a = kristallines Rinderinsulin

b = Hybridinsulin aus A-Kette 16 und natürlicher Rinderinsulin-B-Kette

c = Rinderinsulin-S-Sulfonat-B-Kette

3.6 Tabelle 1

Ausbeuten an synthetischen Insulin-A-Ketten, bezogen auf die erste Aminosäure auf dem Trägerharz

Erläuterung der Buchstabenbezeichnungen:

a = Hydrobromid der Tetra-SH-geschützten A-Kette

b = S-Sulfonat-A-Kette

c = mittels DEAE-Sephadex A-25 gereinigte Tetra-S-sulfonat-A-Kette

Kette	a	b	c
1	27 %	10 %	
2	30 %	18 %	
3	31 %	17 %	
4	58 %	36 %	8 %
5	38 %	33 %	12 %
6	70 %	53 %	22 %
7	54 %	32 %	17 %
8	36 %	18 %	3 %
9	25 %	14 %	9 %
10	23 %	14 %	7 %
11	43 %	30 %	14 %
12	21 %	14 %	7 %
13	10 %	6 %	2 %
14	64 %	19 %	5 %
15	72 %	38 %	16 %
16	46 %	37 %	17 %
17	46 %	40 %	16 %

3.7 Aminosäurenanalysen der synthetisierten Insulin-A-Ketten

Als Bezugswerte zur Berechnung der Verhältniszahlen bei allen Aminosäurenanalysen diente der Durchschnittswert aus den gefundenen Molzahlen von Leucin und Glutaminsäure. Diese beiden Aminosäuren sind in allen Ketten enthalten, sie sind unter den gewählten Hydrolysenbedingungen stabil, sie sind nie direkt an das Trägerharz angeestert und die zu diesen Aminosäuren benachbarten Bindungen werden quantitativ gespalten.

Die Säureamidgruppen von Asn und Gln werden bei der Hydrolyse zu Carboxylgruppen verseift, so daß diese Aminosäuren als Glu bzw. Asp in der Analyse erscheinen.

Die zu niedrigen Werte für Ile und Val ergeben sich aus der unvollständigen Hydrolyse der Ile-Val-Peptidbindung [81].

Cysteinsulfonsäure bzw. S-Bzl-cystein wurden nicht bestimmt, da ersteres zum größten Teil bei der Hydrolyse zerstört wird und letzteres wiederum nur zum Teil hydrolysiert wird.

Serin und Tyrosin sind unter den gewählten Hydrolysenbedingungen ebenfalls nicht stabil [82], besonders Serin wird dabei zerstört.

Bei Harzhydrolysen erklären sich die viel zu niederen Tyrosinwerte daraus, daß dieses in der geschützten Kette als O-Bzl-tyrosin vorliegt und der Benzyläther selbst bei 50stündiger Säurehydrolyse mit konz. HCl nur etwa zur Hälfte gespalten wird.

Hydrolysenbedingungen: 2 - 5 mg Peptid wurden in ein Hydrolysenrohr eingewogen, 3 ml konz. HCl p.a. und 3 ml Eisessig zugegeben, gut mit Stickstoff belüftet, an der Spitze zugeschmolzen und 24 - 48 h in ein Hydrolysenbad von 110 ^{o}C gestellt. Die Hydrolysenflüssigkeit wurde anschließend i. V. eingedampft, zur Entfernung der HCl noch mehrmals mit Wasser aufgenommen und wiederum eingedampft.

Erläuterung der in der Tabelle 2 aufgeführten Buchstabenbezeichnungen:

a = berechnete Werte

b = gefundene Werte bei Hydrolysen S-Bzl geschützter A-Ketten

c = gefundene Werte bei Hydrolysen von S-Sulfonat-A-Ketten

d = gefundene Werte bei Hydrolysen von über DEAE-Sephadex gereinigten S-Sulfonat-A-Ketten

e = gefundene Werte von über DEAE-Sephadex gereinigten S-Sulfonat-A-Ketten, die mit Leucinaminopeptidase gespalten wurden [83].

Tabelle 2: Aminosäurenanalysen

Kette	1			2			3			4			
AS.	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	d
Ala	4	4, 14	3, 39	4	4, 48	3, 52	4	4, 3	4, 24	4	3, 94	4, 2	4, 00
Glu	4	3, 76	3, 94	4	3, 88	3, 98	4	3, 78	3, 68	4	3, 83	4, 00	3, 89
Gly	2	1, 19	1, 01	2	1, 28	1, 21	2	1, 06	1, 05	2	1, 47	1, 45	1, 59
Ile	1	0, 42	0, 66	1	0, 45	0, 61				1	0, 66	0, 73	0, 77
Leu	2	2, 24	2, 07	2	2, 21	2, 04	2	2, 24	2, 31	2	2, 18	2, 01	2, 11
Phe	1	1, 33	0, 44	1	1, 37	0, 58	1	1, 27	0, 93	1	1, 17	1, 05	1, 04
Tyr	1	0, 73	0, 68	1	0, 77	0, 85	1	0, 77	1, 06	1	0, 80	0, 90	0, 83
Val	2	1, 14	1, 57	2	1, 26	1, 56	3	1, 37	1, 88	2	1, 46	1, 78	1, 62

Kette	5			6			7			8		
AS.	a	c	d	a	c	d	a	c	d	a	c	d
Ala	4	3, 81	4, 00	6	6, 25	6, 13	6	6, 26	6, 22	1	1, 17	1, 15
Asp										2	1, 47	1, 45
Glu	4	3, 89	3, 95	4	3, 88	3, 96	4	3, 88	3, 94	4	3, 87	4, 00
Gly	2	1, 83	1, 75	2	1, 71	1, 88	2	1, 87	1, 97	2	2, 03	2, 00
Ile	1	0, 81	0, 81	1	0, 74	0, 88	1	0, 85	0, 89	1	0, 84	0, 77
Leu	2	2, 12	2, 07	2	2, 12	2, 04	2	2, 14	2, 06	2	2, 14	2, 24
Phe	1	1, 23	0, 90	1	1, 10	1, 04	1	1, 05	1, 02			
Ser										1	0, 38	0, 90
Tyr	1	0, 83	0, 63							2	0, 87	1, 61
Val	2	1, 66	1, 64	1	0, 77	0, 84	1	0, 88	0, 93	2	1, 91	1, 87

Kette 9				10			11			12		
AS.	a	c	d	a	c	d	a	c	d	a	c	d
Ala	4	4, 13	4, 04	4	4, 28	4, 18	4	3, 93	3, 97	4	4, 09	4, 18
Asp				2	2, 08	2, 02	1	0, 90	0, 91	1	0, 83	0, 92
Glu	4	3, 84	3, 87	2	1, 68	1, 84	3	2, 95	2, 97	3	2, 84	2, 88
Gly	2	1, 85	1, 86	2	1, 78	1, 95	2	1, 76	1, 85	2	1, 71	1, 91
Ile	1	0, 78	0, 90	1	0, 81	0, 89	1	0, 82	0, 88	1	0, 75	0, 79
Leu	2	2, 18	2, 14	2	2, 32	2, 16	2	2, 05	2, 04	2	2, 16	2, 12
Phe	1	1, 12	1, 08	1	1, 18	1, 07	1	1, 04	0, 99	1	1, 09	1, 02
Tyr	1	0, 81	0, 63	1	0, 87	0, 68	1	0, 76	0, 53	1	0, 77	0, 59
Val	2	1, 78	1, 86	2	1, 71	1, 82	2	1, 74	1, 82	2	1, 65	1, 81

Kette 13				14				15			
AS.	a	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
Ala	1	1, 04	1, 08	1	1, 01	1, 26	1, 22	5	5, 11	4, 98	5, 25
Asp	2	2, 20	2, 03	2	2, 28	1, 29	1, 30				
Glu	4	3, 86	3, 83	4	3, 96	3, 82	3, 86	4	3, 98	3, 88	3, 93
Gly	2	1, 80	1, 89	2	2, 31	1, 26	1, 42	2	1, 88	1, 29	1, 49
Ile	1	0, 77	0, 84	1	0, 82	0, 75	0, 70	1	0, 80	0, 76	0, 87
Leu	2	2, 19	2, 16	2	2, 05	2, 18	2, 14	2	2, 02	2, 12	2, 06
Phe								1	1, 20	0, 91	1, 09
Ser	1	0, 34	0, 44	1	0, 36	0, 46	0, 39				
Tyr	2	1, 60	1, 54	2	1, 48	1, 43	1, 30				
Val	2	1, 66	1, 73	2	1, 77	1, 85	1, 88	2	1, 58	1, 65	1, 80

Kette 16					17			
AS.	a	c	d	e	a	c	d	e
Ala	4	3, 96	4, 04	4, 49	4	4, 05	3, 96	4, 50
Glu	4	3, 90	3, 92	2, 82	4	3, 80	3, 92	3, 06
Gln				0, 37				0, 28
Gly	2	1, 78	1, 92	1, 92	2	1, 74	1, 80	1, 87
Ile	1	0, 82	0, 85	1, 02	1	0, 78	0, 86	0, 98
Leu	2	2, 10	2, 08	2, 00	2	2, 20	2, 09	2, 00
Tyr	2	1, 72	1, 58	1, 58	2	1, 62	1, 58	1, 60
Val	2	1, 80	1, 85	2, 00	2	1, 71	1, 76	1, 92

Hydrolysen vom Harz

Kette	1 - 3		4		5		8	
Teilstück	A21 - A11		A21 - A8		A21 - A8		A21 - A15	
AS.	a	b	a	b	a	b	a	b
Ala	3	3,24	4	3,89	4	3,70		
Asp							2	1,63
Glu	2	2,02	2	2,04	2	2,04	2	1,88
Gly			1	0,62	1	0,85		
Leu	2	1,95	2	1,96	2	2,12	1	1,15
Phe	1	1,11	1	1,12	1	1,04		
Tyr	1	0,47	1	0,52	1	0,54	1	0,54
Val			1	0,64	1	0,83		

3.8 Tabelle 3

Biologische Aktivitäten der Hybridinsuline aus synthetischen A-Ketten und natürlicher Rinderinsulin-B-Kette sowie eines Rekombinats aus natürlicher Rinderinsulin-A- und B-Kette im Mäusefalltest.

Kette	Aktivität Mittelwert in %	Standardabweichung vom Mittelwert s	in %	Zahl der zum Test verwendeten Mäuse
$A_{nat.}$	61,8	$\pm$ 13,5	$\pm$ 22	200
1	1,0	$\pm$ 0,42	$\pm$ 41	100
2	1,3	$\pm$ 0,45	$\pm$ 35	100
3	0,3	$\pm$ 0,21	$\pm$ 71	100
4	2,2	$\pm$ 0,52	$\pm$ 24	130
5	2,4	$\pm$ 0,94	$\pm$ 39	180
6	0,8	$\pm$ 0,38	$\pm$ 47	100
7	2,8	$\pm$ 0,93	$\pm$ 33	190
8	2,0	$\pm$ 0,53	$\pm$ 27	100
9	8,6	$\pm$ 3,32	$\pm$ 39	120
10	2,0	$\pm$ 0,44	$\pm$ 22	120

Kette	Aktivität Mittelwert in %	Standardabweichung vom Mittelwert s	in %	Zahl der zum Test verwendeten Mäuse
11	12,5	± 3,2	± 26	120
12	4,9	± 0,88	± 18	120
13	8,9	± 2,16	± 24	120
14	4,5	± 1,21	± 27	150
15	3,4	± 0,89	± 26	120
16	15,4	± 1,82	± 12	100
17	19,5	± 3,46	± 18	100

Tabelle 4

Biologische Aktivitäten der Hybrindinsuline aus über DEAE-Sephadex gereinigten synthetischen A-Ketten [66] und Rinderinsulin-B-Kette im Mäusefalltest.

Kette	Aktivität Mittelwert in %	Standardabweichung vom Mittelwert s	in %	Zahl der zum Test verwendeten Mäuse
4	4,7	± 0,63	± 13	120
5	4,8	± 0,97	± 20	120
6	4,2	± 0,71	± 18	110
7	4,0	± 0,95	± 24	120
8	5,0	± 1,23	± 25	100
9	16,3	± 1,6	± 10	120
10	3,0	± 0,8	± 27	110
11	16,7	± 1,78	± 11	100
12	9,6	± 1,94	± 20	100
13	20,9	± 2,88	± 14	120
14	8,2	± 1,46	± 18	120
15	5,5	± 0,62	± 11	120
16	33,6	± 4,81	± 14	120
17	34,6	± 4,88	± 14	110

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.1 Schutzgruppen

4.1.1 α-Aminoschutzgruppe

Zur Blockierung der α-Aminogruppe während der Ankondensation der Aminosäuren wurde die N-t-BOC-Schutzgruppe verwendet. Die entsprechenden Aminosäurenderivate sind einfach und in guter Ausbeute darstellbar. Die Schutzgruppe selbst läßt sich unter milden Bedingungen mit 1 N HCl in Eisessig abspalten, wobei allerdings Glutamin teilweise in Pyroglutaminsäure umgewandelt werden soll. [29] Bei der Synthese von A-Kette 8 wurde der N-t-BOC-Rest mit 50%iger Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 abgespalten. Die Ergebnisse bei dieser Synthese waren jedoch so enttäuschend, daß diese Abspaltungsmethode nicht mehr angewandt wurde.

4.1.2 Hydroxylschutzgruppe

Die OH-Gruppen des Serins und Tyrosins wurden für den Verlauf der Peptidsynthese als Benzyläther geschützt. Dieser Schutz ist unter den Synthesebedingungen stabil. Er wird gleichzeitig mit der Abspaltung des Peptids vom Trägerharz mittels HBr / Trifluoressigsäure entfernt.

4.1.3 Carboxylschutzgruppe

Die ß- bzw. γ-Carboxylgruppe der Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure wurde für den Verlauf der Synthese als Benzylester geschützt. Diese Ester sind unter den Synthesebedingungen stabil und können mit HBr / Trifluoressigsäure abgespalten werden. Die Abspaltung des γ-Benzylesters der Glutaminsäure verläuft nicht vollständig, hierzu ist eine nochmalige Behandlung des Peptids mit HBr / Trifluoressigsäure nötig [19].

Wegen der nicht quantitativ verlaufenden Abspaltung des γ-Benzylesters der Glutaminsäure bei einmaliger Behandlung mit HBr / Trifluoressigsäure und wegen der schlechten Ausbeuten bei Einführung des N-t-BOC-Restes bei Glu-γ-O-Bzl mit t-BOC-Azid wurde zeitweilig die Verwendung von Glu-γ-t-butylester [84] erwogen, bei dem die oben genannten Nachteile entfallen. Gegen die Verwendung dieses Esters sprach jedoch seine Instabilität gegen HCl / Eisessig. Hierdurch werden im Verlauf der Synthese die γ-Carboxylgruppen der Glutaminsäure frei, was bei Kupplung weiterer Aminosäuren mittels DCCI zur Bildung zyklischer Peptide führen kann.

4.1.4 SH-Schutzgruppen

Zum Schutz der SH-Gruppe des Cysteins während der Synthese wurde zunächst die S-Bzl-Schutzgruppe gewählt. Diese Schutzgruppe ist zwar unter den Synthesebedingungen absolut beständig, kann jedoch nur mit Na in flüssigem NH_3 [85] oder mit flüssigem HF [86] abgespalten werden. Letztere Abspaltungsmethode war in unserem Laboratorium nicht möglich. Durch die Entfernung der S-Bzl-Schutzgruppe mit Na in flüssigem NH_3 wird ein Teil des aminoendständigen Glycins, möglicherweise auch ein Teil der carboxylendständigen Aminosäure, abgespalten [64], ferner tritt eine teilweise Entschwefelung des Cysteins ein [75]. Einen Vorteil bietet die Na in flüssigem NH_3 Behandlung insofern, als hierbei sämtliche als Benzylester geschützten Carboxylgruppen, die durch HBr / Trifluoressigsäure nicht gespalten wurden, freigesetzt werden [87].
Andere SH-Schutzgruppen wie S-Trityl- [88], S-p-Methoxy-benzyl- [89], S-Benzoyl- [90], S-Carbamoyl- [91], S-Acetyl- [92], S-Benzyloxycarbonyl- [92] oder S-Diphenylmethyl- [19] bringen gegenüber der S-Benzyl-Schutzgruppe keine Vorteile.

Eine bessere Verwendbarkeit als die S-Benzyl-Schutzgruppe bei der Peptidsynthese am Festkörper versprach der Schutz der SH-Gruppe des Cysteins als asymmetrisches Disulfid [93]. Dieses Ver-

fahren des SH-Schutzes wurde zum erstenmal von WEBER [35] bei einer Insulin-A-Ketten-Synthese am Festkörper mit Erfolg angewendet.

In dieser Arbeit wurden als asymmetrische Disulfide des Cysteins die S-Äthyl-mercapto- und S-Benzyl-mercapto-Schutzgruppen zu Synthesen eingesetzt. In ihrer Verwendbarkeit erwiesen sich diese beiden Schutzgruppen als gleichwertig (Synthesen der A-Ketten 16 und 17). Diese als Schutzgruppen verwendeten asymmetrischen Disulfide sind unter den Synthesebedingungen und gegen HBr / Trifluoressigsäure stabil, sie können quantitativ mittels der oxydativen Sulfitolyse abgespalten werden. Hierbei entsteht Cysteinsulfonsäure bzw. aus der als asymmetrisches Disulfid SH-geschützten A-Kette sofort deren S-Sulfonat-Form.

Reduktiv lassen sich diese asymmetrischen Disulfide mit Thiophenol, Thioglykolsäure oder Mercaptoäthanol abspalten, was sogar den Einsatz der geschützten A-Ketten zur Rekombination ermöglicht. Mit Hilfe dieser Schutzgruppen wurden während dieser Arbeit Insulin-A-Ketten synthetisiert, deren Rekombinate mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette mindestens dreimal so aktiv waren als die der mit S-Bzl-Schutz synthetisierten A-Ketten.

4.2 Synthesemethoden

Die Ankupplung der einzelnen Aminosäuren bei der Peptidsynthese erfolgte mittels aktivierter Ester oder DCCI.

Bei den Synthesen mit aktivierten Estern wurden alle Aminosäuren außer Valin als p-Nitrophenylester eingesetzt. Bei letzterem wurde der Hydroxysuccinimidester verwendet, da der p-Nitrophenylester des N-t-BOC-Valins nicht kristallin erhalten werden konnte.

Die Umsatzraten der p-Nitrophenylester des Glycins und Isoleucins und des Hydroxysuccinimidesters des Valins waren bei der A-Kettensynthese am Festkörper unbefriedigend, so daß diese Aminosäuren später nur noch mittels DCCI ankondensiert wurden.

Der erhöhte Arbeitsaufwand zur Herstellung der aktivierten Ester, deren zum Teil schlechte Umsatzraten bei der Festkörper-Peptidsynthese und die Tatsache, daß eine nur mit aktivierten Estern durchgeführte Synthese bei asymmetrischem Disulfidschutz der SH-Gruppe des Cysteins nicht möglich ist, führten dazu, daß der DCCI-Verknüpfungsmethode der Vorzug gegeben wurde. Lediglich Asparagin und Glutamin wurden weiterhin als p-Nitrophenylester eingesetzt, da eine Ankondensation dieser Aminosäuren mit DCCI zu starker Nitrilbildung an deren Säureamidgruppierungen führt [94].
Im Peptidverband tritt diese Nitrilbildung nicht mehr auf, weshalb die folgenden Aminosäuren des Asparagins bzw. Glutamins mit DCCI angekuppelt werden können.
Die Anknüpfung der Aminosäuren mit DCCI führte zu befriedigenden Umsatzraten, diese konnten bei Erhöhung der Konzentration der zur Reaktion gebrachten Aminosäuren noch gesteigert werden [95].
Hohe Konzentrationen der anzukondensierenden Aminosäuren lieferten zwar keine höheren Ausbeuten, jedoch biologisch erheblich wertvollere A-Ketten. Die Ankondensation der Aminosäuren bei hoher Konzentration brachte in Verbindung mit asymmetrischem Disulfidschutz der SH-Gruppen des Cysteins die besten Ergebnisse in dieser Arbeit (A-Ketten 16 und 17).

4.3 Aminosäurensequenz der synthetisierten A-Ketten

Nach geringen biologischen Aktivitäten, die die Rekombinationen der 6- bis 8fach variierten A-Ketten 1 - 7 erbrachten, wurde versucht, durch Verringerung der Anzahl der ausgetauschten Aminosäuren zu besseren Ergebnissen zu gelangen. Hierzu wurde zunächst eine A-Kette mit der Sequenz der natürlichen Schafinsulin-A-Kette synthetisiert (A-Kette 8), deren Rekombinate jedoch ebenfalls eine geringe biologische Aktivität erbrachten, was wahrscheinlich auf die Abspaltung der N-t-BOC-Reste mit 50%iger Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 zurückzuführen war.

Daraufhin wurde die Notwendigkeit der Glutamine in A5 und A15 für die biologische Aktivität des Insulins untersucht. Dabei sollte gleichzeitig auch die Austauschbarkeit dieser Aminosäuren gegen Asparaginsäure geprüft werden. Im Falle von Glutamin in A5 konnte diese Aminosäure ohne Wirkungsverlust gegen Asparaginsäure ausgetauscht werden. Die Annahme, daß hiermit auch der Austausch dieser Aminosäure gegen Glutaminsäure ohne Wirkungsverlust möglich sein müßte, wurde durch die Synthesen der A-Ketten 16 und 17 bestätigt.

Über den Austausch von Glutamin in A15 gegen Asparaginsäure konnte kein klares Ergebnis erzielt werden, da bei der zu diesem Zweck synthetisierten A-Kette 10 durch Verwechslung der Reaktionsgefäße versehentlich auch die Glutaminsäure in A17 durch Asparaginsäure ersetzt wurde. Die biologischen Aktivitäten der Rekombinate dieser A-Kette waren zu nieder, um eine sichere Aussage zu erlauben. Daher wurde Glutamin in A15 bei allen weiteren A-Ketten-Synthesen beibehalten.

Anhand der mit den A-Ketten 9, 11, 16 und 17 erzielten Ergebnisse konnten die schon bekannten Möglichkeiten des Austausches der Asparagine in A21 und A18 gegen Alanin, des Glutamins in A5 gegen Glutaminsäure, des Tyrosins in A19 gegen Phenylalanin sowie des Serins in A12 gegen Alanin [18] mit größerer Sicherheit als bisher bestätigt werden.
Die Rekombinate der oben aufgezählten synthetischen A-Ketten, in denen die aufgeführten Variationen enthalten waren, hatten die gleichen oder höhere biologische Aktivitäten als die Rekombinate der mit der Sequenz des Schafinsulins synthetisierten A-Kette 13.

Der Austausch von Glutamin in A15 gegen Glutaminsäure, Tyrosin in A14 gegen Alanin [17] und Valin in A10 gegen Alanin [78] ist möglich. Ob hierbei ein partieller Wirkungsverlust eintritt, konnte mit den geringen erzielten biologischen Aktivitäten der Rekombinate dieser A-Ketten nicht festgestellt werden. Es ist nicht auszuschließen, daß bei einer Synthese der hochvariierten Ketten 5 - 7, in denen die zuletzt erwähnten Variationen enthalten waren, unter Einsatz hoher Aminosäurenkonzentrationen im Reaktionsmedium wäh-

rend des Kupplungsschrittes ebenfalls A-Ketten erhalten werden können, deren Rekombinate höhere biologische Aktivitäten erbringen.

4.4 Reinigung der synthetischen S-SO_3-A-Ketten und Anreicherung des Hybridinsulins

Mit der Reinigungsmethode nach ZAHN und SHIMONISHI auf S-SO_3-Gruppen an DEAE-Sephadex A-25 wurden gute Erfolge erzielt. Mit diesem Verfahren konnten die synthetischen A-Ketten so weit gereinigt werden, daß ihre Rekombinate etwa die doppelte biologische Aktivität als die der ungereinigten A-Ketten besaßen. Das biologisch aktive Material in denen zu dieser Reinigung eingesetzten A-Ketten konnte nahezu quantitativ, zum Teil auch in höherer Ausbeute, wiedergewonnen werden. Letzterer Befund stützt die Annahme von ZAHN, daß unreine A-Ketten die Rekombination inhibieren [66].
Die höchste biologische Aktivität, die mit einer nach dieser Methode gereinigten A-Kette nach Rekombination mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette erzielt wurde, betrug etwa 30 % des natürlichen Rinderinsulins. Vergleicht man mit diesem Wert die biologische Aktivität einer Rekombination aus natürlichen Rinderinsulin-A- und -B-Ketten, welche etwa 60 % des natürlichen Rinderinsulins beträgt, so kann angenommen werden, daß etwa 50 % des synthetischen Materials intakte A-Ketten mit vollständiger Sequenz sind.

Ferner konnte bei dieser Reinigungsmethode der synthetischen A-Ketten über DEAE-Sephadex festgestellt werden, daß die zur Abspaltung des S-Bzl-Schutzes mit Na in flüssigem NH_3 behandelten Ketten 4, 14 und 15 schlechtere Ausbeuten ergaben, als die mit asymmetrischem Disulfidschutz des Cysteins synthetisierten A-Ketten. Diese Tatsache bestätigt wiederum die teilweise Entschwefelung des Cysteins bei dieser Entfernung der S-Bzl-Schutzgruppe dieser Aminosäure.

Die Anreicherung eines Hybridinsulins wurde mit dem Hybrid aus

der A-Kette 16 und natürlicher Rinderinsulin-B-Kette durchgeführt. Die Auftrennung der bei der Rekombination entstandenen Proteine erfolgte nach dem Molekulargewicht an einer mit Sephadex G-50 gefüllten Säule. Die im Molekulargewicht dem natürlichen Rinderinsulin entsprechende Fraktion besaß eine biologische Aktivität von 75 % des kristallinen Rinderinsulins, bezogen auf Proteineinwaage. Das erhaltene Produkt war elektrophoretisch nicht einheitlich (siehe Abb. 7, S. 54), so daß eine weitere Steigerung der biologischen Aktivität durch Reinigung dieses Hybridinsulins mittels Ionenaustauscherchromatographie denkbar ist. Dieser Reinigungsschritt konnte nicht mehr durchgeführt werden, da hierfür zu wenig Material zur Verfügung stand.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthesen von 17 Insulin-A-Ketten nach der Festkörpermethode werden beschrieben. Drei der synthetisierten A-Ketten hatten die Sequenz der Schafinsulin-A-Kette, die restlichen waren vier- bis achtfach variiert.

Die Kupplungsmethode der Aminosäuren mit DCCI erwies sich bei der Synthese am Festkörper der p-Nitrophenylestermethode als überlegen. Sie lieferte in kürzerer Zeit und bei geringerem Arbeitsaufwand ein biologisch wertvolleres Material, bedingt durch einen besseren Reaktionsumsatz. Durch Erhöhung der Aminosäurenkonzentrationen während der Reaktion konnten diese Umsatzraten noch gesteigert werden. Auf diese Weise wurden A-Ketten synthetisiert, deren Rekombinate mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette eine biologische Aktivität von 30 % erbrachten.

Bei dem Vergleich der S-Bzl-Schutzgruppe mit dem asymmetrischen Disulfidschutz der SH-Gruppe des Cysteins stellte sich letztere als die eindeutig bessere für die Festkörperpeptidsynthese heraus. Mit dem asymmetrischen Disulfidschutz konnten mit weniger Arbeitsaufwand und besserer Endausbeute A-Ketten erhalten werden, deren Rekombinate eine erheblich höhere biologische Aktivität besaßen als die der mit S-Bzl-Schutz synthetisierten A-Ketten.

Durch Fraktionierung der Proteine aus den Rekombinationen einer synthetischen A-Kette mit natürlicher Rinderinsulin-B-Kette nach dem Molekulargewicht wurde ein Hybridinsulin angereichert, das 75 % der biologischen Aktivität des kristallinen Rinderinsulins hatte.

Es wurde ferner gezeigt, daß sowohl die Glutamine in A5 und A15 als auch die Glutaminsäuren in A4 und A17 durch Asparaginsäure ersetzt werden können. Bei dem Austausch von Glu in A4 bzw. Gln in A5 gegen Asp tritt kein Wirkungsverlust ein. Wie weit dies bei dem Austausch der Aminosäuren A15 und A17 der Fall ist, konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Eine Restaktivität ist auch bei diesen Variationen noch vorhanden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1 J. biol. Chem. 241, 2491 (1966)

2 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967)

3 H. Brown, E. Sanger und R. Kitai, Biochem. J. 60, 556 (1955)

4 G.H. Dixon und A.C. Wardlaw, Nature 188, 721 - 725 (1960)

5 Y.-c. Du, Y.-s. Zhang, Z.-x. Lu, C.-l. Tsou
Scientia Sinica 10, 84 - 104 (1961)

6 J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff,
R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg,
T. Okuda und H. Zahn, Z. Naturforschung. 18 b, 1120 (1963)

7 P.G. Katsoyannis, K. Fukuda und A. Tometsko
J. Amer. Chem. Soc. 85, 2863 (1963)

8 P.G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki
und M. Tilak, J. Amer. Chem. Soc. 86, 930 (1964)

9 Y. Wang, J.-Z. Hsu, W.-c. Chang, L.-l. Cheng, H.-s. Li,
C.-y. Hsing, P.-t. Shi, T.-p. Loh, A.-h. Chi, C.-h. Li,
Y.-h. Yieh und K.-l. Tang, Scientia Sinica 14, 1887 (1965)

10 P.G. Katsoyannis, A. Tometsko, J.Z. Ginos und M.A. Tilak
J. Amer. Chem. Soc. 88, 164 (1966)

11 P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. Chem. Soc. 88, 166 (1966)

12 P.G. Katsoyannis, A. Tometsko und C. Zalut
J. Amer. Chem. Soc. 89, 4505 (1967)

13 P.G. Katsoyannis, A.C. Trakatellis, C. Zalut, S. Johnson,
A. Tometsko, G. Schwarz und J. Ginos
Biochemistry 6, 2656 (1967)

14 U. Weber, F. Schneider, P. Köhler und G. Weitzel
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 947 (1967)

15 U. Weber, S. Hörnle, G. Griese, K. Herzog und G. Weitzel Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1715 (1967)

16 U. Weber, S. Hörnle, P. Köhler, G. Nagelschneider, K. Eisele und G. Weitzel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 512 (1968

17 S. Hörnle, U. Weber und G. Weitzel Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1428 (1968)

18 U. Weber, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1749 (1968)

19 P. Köhler, Naturwiss. Dissertation, Tübingen (1969)

20 R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)

21 R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 86, 304 (1964)

22 R.B. Merrifield, Biochemistry 3, 1385 (1964)

23 R.B. Merrifield, J. Org. Chem. 29, 3100 (1964)

24 R.B. Merrifield, Endeavour 24, 3 (1965)

25 R.B. Merrifield, Science 150, 178 (1965)

26 R.B. Merrifield und J.M. Stewart, Nature [London] 207, 522 (1965

27 B. Gutte und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc, 91, 501 (196

28 R.B. Merrifield, Adv. in Enzymology 32, 221 (1969)

29 J.M. Stewart und J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis W.H. Freeman and Co, San Francisco

30 A. Marglin und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 88, 501 (1966)

31 H. Zahn, T. Okuda und Y. Shimonishi, Angew. Chem. 79, 424 (19

32 T. Okuda und H. Zahn, Die Makromolekulare Chemie 121, 87 (196

33 S. Hörnle, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1355 (1967)

34 U. Weber und G. Weitzel Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 1431 (1968)

35 U. Weber, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1421 (1969)

36 U. Weber, K. Herzog, H. Großmann, S. Hörnle und G. Weitzel
Hoppe-Seyler' s Z. physiol. Chem. 350, 1425 (1969)

37 G. Weitzel, K. Eisele, H. Zollner und U. Weber
Hoppe-Seyler' s Z. physiol. Chem. 350, 1480 (1969)

38 R.J. Block, E.L. Durrum und G. Zweig
A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis
Academic Press, London, S. 95 (1955)

39 Gmelin-Kraut, Handbuch der anorg. Chemie, 7. Aufl. Bd. II, 1
S. 341 (1906)

40 C.A. Carpino, A. Giza und B.A. Carpino
J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1959)

41 Organic Synthesis Vol. XIII, 86

42 L.D. Small, J.H. Bailey und C.J. Cavalitto
J. Amer. Chem. Soc. 69, 1711 (1947)

43 E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)

44 E. Sandrin und R.A. Boissonnas, Helv. chim. Acta 46, 1640 (1963)

45 E. Schröder und E. Klieger, Liebigs Ann. Chem. 673, 208 (1964)

46 L. Benoiton, Can. J. Chem. 40, 570 (1962)

47 E. Schnabel, H. Herzog, P. Hoffmann, E. Klauke und I. Ugi
Liebigs Ann. Chem. 716, 175 (1968)

48 M. Frankel, D. Gertner, H. Jacobsen und A. Zilkha
J. Chem. Soc. 1390 (1960)

49 H.C. Beyerman, C.A.M. Boers-Boonekamp, H. Maasen und
v.d. Brink, Rec. Trav. Chim. des Pays Bas 87, 257 (1968)

50 S. Yurugi, J. pharmac. Soc. Japan 74, 513 (1954)

51 P. Hartter, Biochemische Diplomarbeit, Tübingen (1970)

52 H. Zahn, W. Danho und B. Gutte, Z. Naturforsch. 21 b,
763 (1966)

53 S. Guttmann und R.A. Boissonnas, Helv. chim. Acta 41, 1864 (195

54 Org. Synthesis Coll. Vol. II, 11 (1943)

55 U. Weber, unveröffentlicht

56 W. Grassmann, E. Wünsch, P. Deufel und A. Zwick
Chem. Ber. 91, 538 (1958)

57 K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan 30, 110 (1957)

58 E. Wünsch und G. Fürst
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 329, 109 (1962)

59 E. Wünsch, G. Fries und A. Zwick, Chem. Ber. 91, 542 (1958)

60 G.W. Anderson, J.E. Zimmermann und F.M. Callahan
J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839 (1964)

61 K.W. Pepper, H.M. Paisley und M.A. Young
J. Chem. Soc. London 4097 (1953)

62 R.B. Merrifield, Biochemistry (Washington) 3, 1385 (1964)

63 G.R. Marshall und R.B. Merrifield
Biochemistry (Washington) 4, 2394 (1965)

64 H. Großmann, Biochemische Diplomarbeit, Tübingen (1967)

65 Y. Shimonishi und H. Zahn, Biochim. Biophys. Acta 154, 598 (1968

66 Y. Shimonishi und H. Zahn, Z. Naturforsch. 24 b, 422 (1969)

67 Y.-c. Du, Y.-s. Zhang, Z.-x. Lu und C.-l. Tsou
Scientia Sinica 10, 84 (1961)

68 Y.-c. Du, R.-q. Jiang und C.-l. Tsou
Scientia Sinica 14, 229 (1965)

69 C.-i. Niu, Y.-t. Kung, W.-t. Huang, L.-t. Ke, C.-c. Chen,
Y.-c. Chen, Y.-c. Du, R.-q. Jiang, C.-l. Tsou, S.-c. Hu,
S.-q. Chu und K.-z. Wang, Scientia Sinica 15, 231 (1966)

70 J.L. Bailey und R.D. Cole, J. biol. Chemistry 234, 1733 (1959)

71 P.G. Katsoyannis und A. Tometsko
Proc. nat. Acad. Sci. USA 55, 1554 (1966)

72 D.M. Young und A.H. Lewis, Science New York 105, 368 (1947)

73 F. Weygand und R. Obermeier, Z. Naturforsch. 23 b, 1390 (1968)

75 P.G. Katsoyannis, Diabetes 13, 339 (1964)

76 P.G. Katsoyannis, Amer. J. Med. 40, 652 (1966)

77 D. Brandenburg und H.A. Ooms
Protein and Polypeptide Hormones, Proc. int. Symposium
Liege, Excerpta Medica Foundation Int. Congress Series 161,
482 (1968)

78 H. Großmann, Naturwiss. Dissertation, Tübingen (1970)

79 N. Inukai, K. Nakano und M. Murakami
Bull. chem. Soc. Japan 40, 2913 (1967)
Bull. chem. Soc. Japan 41, 182 (1968)

80 U. Weber, persönliche Mitteilung

81 R.E. Humbel und A.M. Crestfield
Biochemistry (Washington) 4, 1044 (1965)

82 F.H. Carpenter und A. Chrambach
J. Biol. Chem. 237, 407 (1962)

83 J. Martin, Naturwiss. Dissertation, Tübingen (1970)

84 G.W. Anderson und F.M. Callahan
J. Amer. Chem. Soc. 82, 3359 (1960)
Chimia 14, 371 (1960)

85 R.H. Sifferd und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. 108, 753 (1935)

86 S. Sakakibara, Y. Shimonishi, M. Okuda und Y. Kishida, in
H.C. Beyerman, A. van de Linde und W.M. van den Brink,
Peptides, Proc. 8th Europ. Peptide Sympos. Noordwijk,
Sept. 1966, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1967

87 C.W. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 76, 6203 (1954)

88 H. Zahn, W. Danho, G. Schmidt, J. Dahlmans, A. Costopanagiotis und E. Engels, in E. Bricas, Peptides, Proc. 9th Europ. Peptide Sympos. Orsay, April 1968
North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1968

89 S. Sakakibara, Y. Nobuhara, Y. Shimonishi und R. Kiyoi
Bull. chem. Soc. Japan 38, 120 (1965)

90 L. Photaki
J. Amer. Chem. Soc. 88, 2292 (1966)
J. Amer. Chem. Soc. 85, 1337 (1963)

91 S. Guttmann, Helv. chim. Acta 49, 83 (1966)

92 L. Zervas, I. Photaki und N. Ghelis
J. Amer. Chem. Soc. 85, 1337 (1963)

93 N. Inukai, K. Nakano und M Murakami
Bull. chem. Soc. Japan 40, 2913 (1967)
Bull. chem. Soc. Japan 41, 182 (1968)

94 D.T. Gish, P.G. Katsoyannis, G.P. Hess und R.J. Stedman
J. Amer. Chem. Soc. 78, 5954 (1956)

95 W. Geising, Naturwiss. Dissertation, Tübingen (1970)

LEBENSLAUF

Am 14. Juli 1942 wurde ich als Sohn des Bankangestellten Heinrich Herzog und seiner Ehefrau Maria geb. Wind in Künzelsau geboren. Nach dem Besuch der Grundschule in Ilshofen/Württ. trat ich 1953 in das Gymnasium bei St. Michael in Schwäbisch Hall ein, wo ich im Frühjahr 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1962 begann ich mit dem Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Im Oktober 1963 legte ich den ersten und im Januar 1966 den zweiten Teil der Diplom-Vorprüfung für Biochemiker ab.

Nach Beendigung meiner Diplomarbeit über das Thema "Darstellung geschützter Pentapeptide der variierten Insulin-Sequenz A 17 - 21" unter Leitung von Professor Dr. Dr. G. Weitzel bestand ich im Juni 1968 die Diplom-Hauptprüfung für Biochemiker.

Anschließend bearbeitete ich vom Juli 1968 bis Juli 1970 am physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen, ebenfalls unter Leitung von Prof. Dr. Dr. G. Weitzel, die vorliegende Dissertation "Studien zur Merrifield-Synthese an Insulin-A-Ketten".

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren:

Physiologische Chemie:	F. Schneider, G. Weitzel
Anorganische Chemie:	W. Rüdorff
Organische Chemie:	E. Bayer, E. Müller
Physikalische Chemie:	H. Mauser
Physik:	H. Krüger
Mathematik:	W. Schweizer
Anatomie:	K. Mörike
Botanik:	E. Bünning, H. Metzner
Zoologie:	F. P. Möhres
Mikrobiologie:	F. Lingens, H. Zähner
Pharmakologie:	H. Remmer

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen